

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR  
CENTRO POLITÉCNICO – SETOR DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E  
BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE INSETOS PARA  
USO NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL

LIZ NATHALIA IBARRA DUARTE

CURITIBA

2016

LIZ NATHALIA IBARRA DUARTE

PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE INSETOS PARA  
USO NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá  
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Dr. José Dijair Antonino de  
Souza Júnior.

CURITIBA

2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

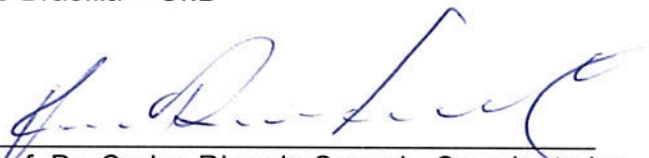
LIZ NATHALIA IBARRA DUARTE

### PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE INSETOS PARA USO NA DEGRADAÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL

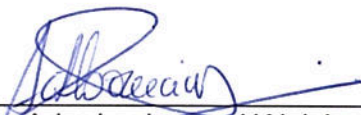
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá - Orientadora  
EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia/Universidade  
de Brasília – UnB



Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol - Co-orientador  
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof.ª. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski - Membro Titular  
Universidade Federal do Paraná – UFPR



Prof. Dr. André Luís Lopes da Silva - Membro Titular  
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. Arion Zandoná Filho - Membro Titular  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Curitiba, 29 de abril 2016

Dedico este trabalho aos meus pais Olga e Rafael, aos meus irmãos Raquel, Enrique e Maria Paz, ao meu namorado Daniel e a todos meus amigos que de alguma ou outra forma, sempre estão presentes para me apoiar.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar esta oportunidade com a que sempre sonhei e me ajudar durante todo esse trajeto. À Virgem por sempre me acompanhar.

Aos meus pais Olga e Rafael, por estarem sempre aí, por me apoiarem desde o início até o final. Aos meus irmãozinhos Raquel, Enrique e Maria Paz, porque alegram e divertem minha vida, porque me fazem sentir orgulhosa deles cada vez mais. Amo todos vocês!

Ao meu namorado Daniel Luiz, o curitibano que conquistou meu coração. Uma pessoa maravilhosa que me ajudou incondicionalmente durante toda esta difícil etapa. Obrigada por toda a paciência e carinho. Amo você!

Ao Dr. Ricardo Soccol, uma pessoa que admiro e respeito muito. Agradeço demais pela oportunidade de crescer e me desenvolver na área da pesquisa, pelo acolhimento ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no qual estou muito orgulhosa de pertencer.

Agradeço à Dra. Fátima Grossi, uma ótima orientadora e cientista que admiro muito. Pela oportunidade, pela paciência, por me receber ao seu laboratório, onde tive a grande oportunidade de aprender tudo desde o princípio e alcançar impulso para ir mais longe.

Agradeço ao Dijair e ao Érico, dois excelentes pesquisadores de pós-doutorado que me orientaram durante todo este tempo. Muito obrigada a vocês pela paciência em me transmitir seus conhecimentos e ter me encaminhado, na minha ignorância, nos experimentos.

Ao Prof. Fernando Araripe, quem com sua grande experiência na expressão de proteínas em leveduras, tem me ajudado sabiamente a esclarecer e enxergar alguns pontos, e finalizar os experimentos satisfatoriamente.

A todo o pessoal do Laboratório de Interação Molecular Planta – Praga (LIMPP) que me ajudou, apoiou e compartilhou comigo durante a minha estadia. Agradeço especialmente ao Athus, à Ariane, à Ana, à Daiane, ao Peyman, ao François, à Caroline, à Thuanne, quem estiveram trabalhando mais de perto comigo.

## RESUMO

Os sequenciamentos dos transcritomas de *Anthonomus grandis* (Bicudo-do-algodoeiro) e de *Telchin licus licus* (Broca-gigante da cana-de-açúcar) possibilitaram o descobrimento e caracterização de novos genes possivelmente envolvidos na degradação da parede celular vegetal. A partir de *contigs* destes transcritomas foram selecionados genes que possuíam similaridade com enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal. Foram elas: (1) uma provável endo-beta-1,4-glucanase [(EGase), EC 3.2.1.4], da família glicosil-hidrolase 45 (GHF45), a qual denominou-se *AgEG1*, por sua proveniência de *A. grandis*; e (2) uma provável xilose-redutase (XR) da família Aldo-ceto redutase 2 (AKR2), que foi chamada *TIXR1* por ser oriunda de *T. licus*. Foram realizadas RT-PCRs a partir de RNA originado do intestino médio destes insetos utilizando-se *primers* específicos para amplificar os genes estudados. Inicialmente, estes genes foram clonados no vetor pGEM-T easy para propagação e sequenciamento. Após o sequenciamento, para o gene *AgEG1* foi obtida uma sequência de tamanho esperado de 650 pb, com proteína predita de 214 aminoácidos; para o *TIXR1* obteve-se uma sequência de tamanho de 980 pb e a sequência proteica predita de 318 aminoácidos. Para validar a função destas proteínas, foi utilizada a levedura *Pichia pastoris* (cepas SMD1168 H e X33) para a expressão heteróloga das proteínas estudadas. Os genes sem a presença da sequência correspondentes ao peptídeo sinal foram clonados no vetor pGAPZ $\alpha$  B, e, conseqüentemente, introduzidos na levedura para expressão. A confirmação da expressão foi determinada mediante SDS-PAGE e *Western blot*. Para *TIXR1*, a expressão foi confirmada, com a presença de uma proteína de aproximadamente 35 kDa, compatível com o tamanho predito da enzima *TIXR1*, expressa na cepa X33. Entretanto, as condições para a expressão do gene *AgEG1* ainda estão sendo determinadas. Os resultados deste trabalho confirmam a hipótese de que o gene *TIXR1* é traduzido em uma proteína de tamanho esperado (candidata a uma xilose-redutase) quando expresso em *P. pastoris*. Os genes *AgEG1* e *TIXR1* podem estar envolvidos na degradação de biomassa vegetal; estes dois genes podem ser promissores para uma proposta visando a produção de biocombustíveis de segunda geração.

Palavras-chave: Insetos - genes - enzimas – *Pichia pastoris* – expressão – proteínas – biocombustíveis.

## ABSTRACT

Transcriptome sequencing of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Telchin licus licus* (Sugarcane Giant Borer) allowed the discovery and characterization of new genes possibly involved in the degradation of plant cell wall. Contigs from these transcriptomes were selected with similarity with enzymes involved in the degradation of plant biomass. We select: (1) a putative endo-beta-1.4-glucanase (EGase), EC 3.2.1.4, Glycoside Hydrolase family-45 (GHF45), which was named *AgEG1*, by their origin from *A. grandis*; and (2) a putative Xylose reductase (XR), an Aldo-Keto reductase from family 2 (AKR2), which was named *TIXR1* because it is from *T. licus*. RT-PCRs were performed from RNA originated from midgut of these insects using specific primers to amplify the genes studied. Initially, these genes were cloned into pGEM-T easy vector to multiply and sequencing. After sequencing, for the *AgEG1* gene was obtained a 650 bp sequence matching the expected size, and a predicted protein of 214 amino acids; for the *TIXR1* it was obtained a 980 bp sequence and the predicted protein sequence has 318 amino acids. To validate the function of these proteins it was used the yeast *Pichia pastoris* (strains SMD1168H and X33) for heterologous expression of the studied proteins. The genes lacking the sequence corresponding to the signal peptide were cloned in pGAPZ $\alpha$  B vector, and, consequently, introduced into the yeast for expression. The confirmation of the expression was determined by SDS-PAGE and Western blot. For *TIXR1*, the expression was confirmed with the presence of an approximately 35 kDa protein, compatible with the predicted size of the TIXR. This protein was expressed in X33 strain. However, the conditions for the expression of the gene *AgEG1* are still being determined. The results of this study confirm the hypothesis that the *TIXR1* gene is translated into a protein of expected size (candidate for a Xylose reductase) when expressed in *P. pastoris*. *AgEG1* and *TIXR1* genes may be involved in the degradation of plant biomass. These two genes may be promising for a proposal aiming the production of second generation biofuels.

Keywords: Insects - genes - enzymes - *Pichia pastoris* - expression - proteins - biofuels.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fluxograma do processo de obtenção do etanol de 2ª geração. A matéria prima (cana de açúcar) é submetida a um pré-tratamento físico antes de passar para o tanque de hidrólise. Dentro do tanque podemos observar 1) a composição do bagaço, principalmente de polissacarídeos principais (celulose e hemicelulose), 2) a ação das enzimas que quebram estas moléculas e 3) a liberação de diferentes tipos de açúcares (hexoses e pentoses) que irão para os tanques de fermentação, onde os microorganismos os converterão em etanol. Finalmente o etanol é destilado (etanol anidro) e utilizado como combustível principalmente (OLIVEIRA, 2012).....	20
FIGURA 2. Estrutura linear da celulose. União de monômeros repetitivos de glicose e conformação de uma molécula de celobiose através da ligação glicosídica (FARINAS, 2011). ....	22
FIGURA 3. Diferentes regiões da celulose. A região cristalina que conforma a parte linear e ordenada da cadeia e a região amorfa, mais desuniforme e randomizada (FARINAS, 2011).....	22
FIGURA 4. Hemicelulose. Cadeia linear formada por polissacarídeos e cadeias laterais de diferentes compostos (FARINAS, 2011). ....	23
FIGURA 5. Completa degradação da celulose ate a obtenção de glicose. Ataque das endoglucases nas regiões mais superficiais e amorfas, as exoglucanases de Tipo I agindo nos extremos redutores e as de Tipo II nos extremos não redutores, finalmente as celobíases hidrolisando moléculas de celobiose ate liberar glicose (CARVALHO, 2009).....	29
FIGURA 6. Representação do processo de degradação da xilana através das enzimas xilanólíticas, para a subsequente produção de etanol. (a) a ação das xilanases, acetil-xilana-esterases e feruloil-esterases para dar lugar a xilo-oligossacarídeos e, posteriormente, ao ácido ferúlico junto com o ácido acético. (b) Depois, as Arabinofuranosidases e glucuronidases agem sobre esses xilo-oligossacarídeos e liberam arabinose e ácido glucurônico. (c) As xilobioses e os xilo-oligossacarídeos livres de cadeias laterais, são hidrolisados por ação de xilosidases, que liberam o produto final: xilose. d) Através da via das pentoses fosfato, a xilose e a arabinose são transformados em açúcares fermentáveis e utilizados pelos microrganismos que os convertem em etanol (FARINAS, 2011). ....	31
FIGURA 7. Degradação de uma D-Xilose. Conversão da xilose em xilulose-fosfato para entrar na via das pentoses fosfato (SEIBOTH et al., 2003).....	32
FIGURA 8. Fase oxidativa, primeira etapa da via das pentoses fosfato (PPP). A Glicose-6-fosfato é convertida a ribulose-5-fosfato que ingressa à fase não oxidativa, a seguinte etapa da PPP. Adaptado de Lehninger, 2006.....	33
FIGURA 9. Fase não oxidativa. Etapa final da via das pentoses fosfato (PPP). A Ribulose-5-fosfato pode reagir com uma isomerase ou uma epimerase e se transformar em ribose-5-fosfato ou em xilulose-5-fosfato, ambos produtos podem ser convertidos a fructose-6-fosfato pela ação de enzimas como transquetolases, transcetolases e transaldolases, que catalisam reações entre dois subprodutos derivados de estes substratos iniciais. Adaptado de Lehninger, 2006.....	33
FIGURA 10. Vias metabólicas para o catabolismo da xilose: (1) etapas seguidas pela maioria das bactérias (2) etapas seguidas por alguns fungos e leveduras, (3) oxidação que	



pode acontecer em todos os organismos e (4) fermentação a etanol. Adaptação de Jackson e Nicolson, 2002. ....	34
FIGURA 11. Alinhamento da sequência clonada e sequenciada com a “fase de leitura aberta” (open reading frame (orf), em inglês), do gene <i>AgEG1</i> .....	47
FIGURA 12. Alinhamento da sequência clonada e sequenciada com a “fase de leitura aberta” (open reading frame (orf), em inglês), do gene <i>TIXR1</i> . ....	48
FIGURA 13. Electroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação por PCR do gene <i>AgEG1</i> (650 pb) que provavelmente codifica uma enzima $\beta$ -1,4-Endoglucanase, isolado de <i>A. grandis</i> . ....	49
FIGURA 14. Electroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação por PCR do gene <i>TIXR1</i> (990 pb) que provavelmente codifica uma enzima Xilose-reductase, isolado de <i>T. licus licus</i> . ....	49
FIGURA 15. Histórico da clonagem dos genes <i>AgEG1</i> e <i>TIXR1</i> . Seguindo a direção das setas, inicialmente se apresentam os contigs dos genes, depois da PCR se obtêm as bandas amplificadas e concluindo com a inserção dos genes no vetor pGEM-T Easy linearizado. ....	50
FIGURA 16. Representação da construção pGEM-T Easy_ <i>AgEG1</i> . ....	51
FIGURA 17. Representação da construção pGEM-T Easy_ <i>TIXR1</i> . ....	51
FIGURA 18. Resultado de Blast X realizada no banco de dados GeneBank. O <i>AgEG1</i> possui perto de 70% de semelhança com outras $\beta$ -1,4-endoglucanases endógenas de coleópteros, além de outras celulasas pertencentes a família GH45. ....	52
FIGURA 19. Relações filogenéticas do gene <i>AgEG1</i> . Cada ramo da árvore possui um número que identifica a distância filogenética existente entre cada sequência, a somatória dos ramos da árvore dá um comprimento de 12.52017468. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção Poisson e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 44 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Há um total de 117 posições no conjunto de dados final.....	53
FIGURA 20. Sequência proteica predita do gene <i>AgEG1</i> com 22 kDa. Na sequência estão marcadas a Metionina, que é o resíduo iniciador da proteína (roxo), a His-tag recombinante (azul) e o sítio catalítico conservado das $\beta$ -1,4-endoglucanases da família GH45 (amarelo).....	54
FIGURA 21. Sequência proteica do gene <i>AgEG1</i> . O único sítio de N-glicosilação no resíduo de Asn 70 se encontra distinguido em letra vermelha. ....	54
FIGURA 22. Predição do peptídeo sinal na sequência do gene <i>AgEG1</i> . A figura confirma a presença do peptídeo sinal, representado pelo sítio de clivagem na posição entre os resíduos 19 e 20 e resultados altos nos valores de score.....	55
FIGURA 23. Resultado do BlastX realizado com o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). O gene <i>TIXR1</i> possui altíssima semelhança com outras enzimas endógenas da família Aldo ceto reductases, encontradas em diferentes insetos. ....	56
FIGURA 24. Relações evolutivas dos genes de Aldo-Ceto reductases de diferentes organismos. Cada ramo da árvore possui um número que identifica a distância filogenética existente entre cada sequência, a somatória dos ramos da árvore dá um comprimento de 10.66575625. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção	

Poisson e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 51 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Há um total de 139 posições no conjunto de dados final.....57

FIGURA 25. Sequência proteica do gene *TIXR1* com peso molecular de 32,5 kDa. Na sequência estão ressaltadas o resíduo iniciador que é a Metionina (roxo) e a His-tag recombinante (azul). ..... 58

FIGURA 26. Sequência proteica do gene *TIXR1*. Os sítios de N-glicosilação nos resíduos 97 e 267 Asn na sequência estão distinguidos em letra vermelha. .... 58

FIGURA 27. Análise para predição do peptídeo sinal na sequência do gene *TIXR1*. O valores de todos os scores são muito baixos, perto de 0,1 (valor-alvo negativo), portanto a proteína não possui peptídeo sinal ..... 59

FIGURA 28. Histórico da clonagem do gene *AgEG1* no vetor de expressão. Os DNAs foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SalI* para posteriormente ser ligados nos sítios correspondentes, dando como resultado o constructo pGAPZαB-*AgEG1*..... 60

FIGURA 29. Histórico da clonagem do gene *TIXR1* no vetor de expressão. Os DNAs foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *NotI* para posteriormente ser ligados nos sítios correspondentes, dando como resultado o constructo pGAPZαB-*TIXR1*. .... 61

FIGURA 30. Gel de agarose 1% para confirmar a clonagem dos genes *AgEG1* e *TIXR1* no vetor pGAPZαB, através de reações de digestão. A reação foi efetuada com as enzimas de restrição para clivar e liberar os genes de interesse, ligados ao vetor pGAPZαB. Gel A: liberação de fragmentos de 990 pb correspondente ao gene *TIXR1*. Gel B: liberação de fragmentos de 650 pb correspondentes ao gene *AgEG1*..... 62

FIGURA 31. Vetor de expressão pGAPZαB-*AgEG1* linearizado com a enzima *BglII*. O construto apresenta um tamanho de 3680 pb, o gene *AgEG1* está inserido entre os sítios de *EcoRI* e *SalI* (vermelho)..... 63

FIGURA 32. Vetor de expressão pGAPZαB-*TIXR1* linearizado com a enzima *BspHI*. O construto apresenta um tamanho de 4085 pb, o gene *TIXR1* está inserido entre os sítios de *EcoRI* e *NotI* (vermelho). .... 63

FIGURA 33. PCR de colônias de dos clones integrados em *Pichia pastoris* (X33). Linhas 1, 2 e 3: três colônias transformadas com o gene *AgEG1* (EG1, EG2 e EG3); linha 4: marcador 1 kb; linha 5: controle positivo do gene *AgEG1*; linha 6: controle negativo (vetor vazio, sem o gene); linha 7: controle negativo 2 (branco da reação). Linha 8, 9, 10, 12, 13 e 14: diferentes colônias transformadas com o gene *TIXR1* (XR1, XR2, XR3, XR4, XR5, XR6); linha 11: marcador 1 kb; linha 15: controle negativo (branco da reação); linha 16: controle positivo do gene *TIXR1*. Pode-se ver os tamanhos de 650 pb para o gene *AgEG1* e 975 pb para o gene *TIXR1*, marcados na imagem frente as linhas 1 e 8, representando a amplificação das bandas..... 64

FIGURA 34. SDS-PAGE 12% com os resultados da migração das amostras de proteína intra e extra celulares, expressadas em *P. pastoris*, contendo o gene *AgEG1*. O Gel A representa as proteínas extracelulares expressadas pelas cepas EG1 e EG2, iniciando com os dias 1, 2, 3, 4 e 5 das alíquotas extraída cada 24 h da EG1, seguidas do MW (marcador Bench Mark Protein Ladder) e continuando com os dias 1, 2, 3 e 4 das amostras da EG2. As bandas candidatas estão marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão, que são mais evidentes, que apresentam um peso de ~30kDa. O Gel B

apresenta a expressão das proteínas intracelulares, cuja sequência começa com as alíquotas 1, 2, 3, 4 e 5, correspondentes aos dias de expressão para EG1, seguidas do MW (marcador Prestained Protein Ladder) e finalizando com as alíquotas 1, 2, 3 e 4 da EG2. Neste caso também aparecem bandas (marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão) com peso molecular perto de 37 kDa..... 66

FIGURA 35. SDS-PAGE 12% com os resultados da migração das amostras de proteína intra e extracelulares, expressadas em *P. pastoris*, contendo o gene *TIXR1*. O Gel A representa as proteínas extracelulares expressadas pelas cepas XR1 e XR3, começando pelo MW (marcador Bench Mark Protein Ladder), desde à direita, continuando com os dias 1, 2, 3, 4 e 5 das alíquotas extraídas cada 24 h da XR1, e seguidas pelos dias 1, 2, 3 e 4 das alíquotas da XR3. Podem-se observar umas bandas candidatas, marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão, que são mais evidentes, apresentando um peso molecular de ~40 kDa. O Gel B apresenta a expressão das proteínas intracelulares, cuja sequência começa com as alíquotas 1, 2, 3, 4 e 5, correspondentes aos dias de expressão para XR1, seguidas do MW (marcador Prestained Protein Ladder) e finalizando com as alíquotas 1, 2, 3 e 4 da XR3. Neste caso também aparecem bandas (marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão) com peso molecular perto de 37 kDa..... 67

FIGURA 36. Western Blotting das proteínas oriundas da expressão dos clones contendo o gene *TIXR1* em *Pichia pastoris*. Na primeira linha se encontra o MW (marcador Prestained Protein Ladder), seguido de: 1) Expressão controle negativo (*P. pastoris* transformada com pGAPZ $\alpha$ -B vazio); 2) Controle positivo (75 kDa); 3) Sobrenadante da cultura aos 5 dias de expressão; 4) Sobrenadante da cultura aos 4 dias de expressão. A provável Xilose Redutase recombinante deve apresentar peso de ~35 kDa..... 68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA O BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR.....	25
TABELA 1 - DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA O BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR - CONTINUAÇÃO.....	26
TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS cDNAs DOS GENES.....	41

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	PROBLEMAS AMBIENTAIS E CRISE ENERGÉTICA.....	15
2.2	ENERGIA ATRAVÉS DE BIOMASSA.....	17
2.2.1	Biocombustíveis: etanol de segunda geração (2G) .....	18
2.3	PAREDE CELULAR VEGETAL (PCV).....	21
2.3.1	Celulose .....	21
2.3.2	Hemicelulose.....	23
2.3.3	Lignina.....	23
2.4	DEGRADAÇÃO DA PCV .....	24
2.5	ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA PCV .....	28
2.5.1	Celulases .....	28
2.5.2	Hemicelulases.....	30
2.6	XILOSE PARA PRODUZIR ETANOL .....	31
2.6.1	Xilose-redutase (XR).....	35
2.7	FONTE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLITICAS .....	36
3	OBJETIVOS .....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1	INSETOS.....	39
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA .....	39
4.3	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>AgEG1</i> E <i>TIXR1</i> .....	40
4.4	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISES DE DADOS .....	41
4.5	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO .....	42
4.6	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA <i>Pichia pastoris</i> E ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DOS GENES <i>AgEG1</i> E <i>TIXR1</i> .....	43
4.7	MICROEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM <i>P. pastoris</i> . .....	44
5	RESULTADOS .....	46
5.1	IDENTIFICAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>AgEG1</i> e <i>TIXR1</i> NO VETOR pGEM-T Easy .....	46
5.2	SEQUÊNCIA PROTEICA, ALINHAMENTO FILOGENÉTICO, SITIOS DE GLICOSILAÇÃO E PEPTÍDEO SINAL. ....	52
5.3	CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM POR DIGESTÃO.....	59

5.4	LINEARIZAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS CLONES TRANSFORMADOS .....	62
5.5	SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING .....	64
6	DISCUSSÃO .....	69
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
	REFERÊNCIAS .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) e a broca-gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*, Lepidoptera: Castniidae) são fontes interessantes de genes envolvidos na degradação de biomassa vegetal. Tais genes são alvo de estudo para muitas pesquisas visando à produção de biocombustíveis, um dos setores que está tomando grande importância no mercado por sua grande repercussão como combustível renovável, o uso de energia verde e aproveitamento de biomassa (no caso do etanol de 2ª Geração).

Existem várias pesquisas focadas na utilização de enzimas que degradam biomassa vegetal, especialmente aquelas provenientes de microrganismos. Os simbioses que formam parte do intestino dos insetos também têm sido alvo de muitos trabalhos. Porém, atualmente as pesquisas estão focadas no descobrimento de enzimas endógenas de insetos para avaliar o potencial catalítico e consequente utilização na produção de etanol. Alguns trabalhos reportam que enzimas endógenas de insetos possuem alta atividade após serem expressas em células de insetos (sistema homólogo) (KIM *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2005; WILLIS *et al.*, 2011).

A expressão de enzimas endógenas de alguns insetos é um fato inovador, contudo precisa ser mais estudado e aprofundado. São necessários mais projetos que envolvam prospecção e avaliação do potencial destas enzimas, mas principalmente, focar os ensaios para a durabilidade e efetividade em relação ao tempo de produção, e, finalmente, em obter biocombustível com alta produtividade, utilizando misturas de enzimas de características desejáveis.

Algumas leveduras como *Pichia pastoris* são excelentes candidatas para os experimentos de expressão de genes de eucariotos. As leveduras, diferentemente das bactérias, são capazes de realizar modificações pós-traducionais como a glicosilação, uma característica desejável, já que muitos das proteínas provenientes de eucariotos precisam desta modificação para serem funcionais. Além disso, em comparação com a expressão em células de insetos, as leveduras possuem um

mecanismo mais simples e menos custoso de transformação, expressão e manutenção das células, além de que, estas são mais resistentes, crescem e se desenvolvem de forma satisfatória em biofermentadores.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 PROBLEMAS AMBIENTAIS E CRISE ENERGÉTICA**

O nível de consumo de energia de um país é um indicador crítico da utilização dos recursos e está associado ao impacto ambiental. Em todos os aspectos da vida cotidiana é imprescindível o gasto da energia: produção de alimentos, bombeamento de águas subterrâneas, a colheita de madeira, o processo de mineração, queima de combustíveis fósseis, etc. O problema existe no consumo indiscriminado da energia em cada país, que quando ultrapassa o limite estabelecido em relação ao tamanho da população, gera um consumo excessivo de energia por pessoa; conduzindo ao esgotamento gradual de toda a base de recursos, que culmina com a produção de uma maior concentração de poluentes (WORLD population balance, 2012).

A Chevron Corporation (2014) estima um aumento da população mundial para 25% nos próximos 20 anos, isso levará a um crescimento significativo do consumo de energia (40%). Depois de que as crises energéticas nos EUA ocorreram nos anos 70, houve uma preocupação mundial durante a crise de 2007-8, pois existe uma maior urgência para defender a soberania energética focando numa proposta de soberania alimentar e financeira; já que por causa desses problemas, existe um desvio importante de matéria prima para uma produção desesperada de hidrocarbonetos, competindo com o setor alimentício, e associando essa crise energética à crise alimentar, somando-lhes uma preocupante crise ambiental (GAMBINA, 2014).

A medida que a energia se esgota, ela vai se tornando mais cara e menos acessível, e novas fontes de energia renovável são cada vez mais necessárias (USBC, 2001). Segundo Miranda (2009), os combustíveis fósseis não-renováveis



como o petróleo, o carvão mineral e o gás natural, são a fonte principal de energia utilizada no mundo, representando 86 % da energia gerada.

Contando com dados da “*International Energy Agency*” (IEA), o petróleo foi considerado o grande impulsionador da economia internacional, na década de 70 representou quase 50% do consumo mundial de energia primária. Apesar de que através do tempo esse valor foi declinando, porém continua cerca de 43% e deverá manter-se relevante por vários anos. O petróleo, além de ser indispensável no setor de transportes, é responsável por 7,9% da geração de energia elétrica no mundo. Mesmo existindo outras fontes diversificadas, ainda assim, vários países utilizam o petróleo como matéria prima para geração de energia elétrica (IEA, 2003). É importante lembrar que o petróleo, sendo um combustível não-renovável altamente demandado, possui reservas mundiais que serão esgotadas com o passar das décadas. De acordo com a previsão da Organização Planeta Sustentável (2012), o petróleo não durará mais que 40 anos. O setor de transportes é um dos maiores responsáveis pela emissão de poluentes, já que a queima de combustíveis fósseis é a principal causa do aumento da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera, o contribuinte mais importante do efeito estufa e do aquecimento global (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Segundo a *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), a emissão de dióxido de carbono tem aumentado exponencialmente em partes por milhão (ppm) desde a revolução industrial, e progressivamente nos últimos anos. Algumas atividades humanas como o desflorestamento e a queima de combustíveis fósseis, como também a própria respiração dos seres vivos, e processos naturais como as erupções vulcânicas, são componentes que promovem que o CO<sub>2</sub> seja liberado continuamente no ambiente (NOAA, 2015). A *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), explica como o vapor de água, o gás mais abundante na atmosfera, com seu processo de retroalimentação amplifica o aquecimento global; esse calor gerado produz maior concentração de CO<sub>2</sub>, que por sua vez permite que mais vapor de água penetre na atmosfera (NASA, 2008). Estudos recentes sobre diferentes cenários de emissões de gases de estufa determinam que, o aumento inquietante da temperatura média global e mudanças nos padrões pluviiais em todo o mundo continuarão e piorarão até o ano de 2100, por causa das altas concentrações desses gases na atmosfera da Terra. Esses problemas

desencadeiam muitos outros que afetam diretamente toda forma de vida no planeta (NASA, 2015).

Portanto, é imprescindível a procura por novos recursos alternativos para a obtenção de combustível, que possam substituir eficientemente o petróleo. A busca por novas fontes de energia deve se dar de acordo com os conceitos de sustentabilidade visando à utilização de fontes de energia limpa e renovável, denominadas “energia verde”. Atualmente, o Brasil é uma referência mundial no que diz respeito à utilização de energia verde (GANDOLFI, 2012).

## 2.2 ENERGIA ATRAVÉS DE BIOMASSA

De acordo com dados do Ministério de Minas e Energia (MME), a metade da energia produzida no Brasil provém de fontes renováveis, sendo que 15,2 % correspondem à energia hidroelétrica e 32% à biomassa (MME, 2010). Biomassa pode ser considerada como qualquer produto biodegradável tais como: 1) resíduos vegetais da agricultura, silvicultura, indústria de alimentos, etc.; 2) Subprodutos da indústria de polpa e papel; 3) Resíduos municipais separados (IEA, 2001). Conforme McKendry (2002), a utilização da biomassa é muito comum em países desenvolvidos, pois é uma fonte potencial para obtenção de energia renovável.

No Brasil pode se destacar a alta e diversificada produção de *commodities*, os quais têm grande potencial para geração de energia sustentável através do aproveitamento da biomassa. Muitos resíduos agrícolas, florestais e industriais produzem uma alta densidade de biomassa que podem ser aproveitados, especialmente quando se leva em conta as culturas economicamente mais importantes para o país, como madeira de eucalipto e cedro; e os das lavouras de café, açúcar e arroz. Protásio e colaboradores (PROTÁSIO *et al.*, 2013) dão uma referência de como vários desses resíduos podem gerar o equivalente em volume de combustível fóssil, entre eles os mais destacados são os florestais, os da cana de açúcar, milho, e em maior proporção os do café; além da notável redução das emissões de CO<sub>2</sub> na atmosfera.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) informa que, o Brasil lidera o ranking como primeiro produtor mundial de cana de açúcar, sendo o

responsável por mais da metade de açúcar comercializado no mundo. Na indústria, o processo da produção de açúcar libera uma grande quantidade de material celulósico a partir dos resíduos da cana, que podem ser eficientemente aproveitados (MAPA, 2012). O país é o segundo maior produtor de etanol no mundo, seguido unicamente pelos EUA; contudo é o primeiro em exportação do biocombustível. Estas duas nações produtoras de etanol, são responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial deste combustível desde o início de 2000. O Brasil destaca-se por utilizar etanol proporcionalmente mais do que qualquer outro país; em 2013 a utilização do etanol como combustível de veículos leves foi de 40%. Por meio deste importante comércio internacional, os biocombustíveis podem contribuir para o aumento da segurança energética (MME 2014).

### **2.2.1 Biocombustíveis: etanol de segunda geração (2G)**

Biocombustível pode ser definido como todo combustível líquido, sólido ou gasoso produzido a partir de organismos vivos; entre eles cabe destacar o etanol, o biodiesel, o biogás e a lenha.

O bioetanol é o principal biocombustível consumido no mundo. No processo de produção, ele é obtido principalmente através da fermentação do açúcar (biocombustível de primeira geração). Dados divulgados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e compilados pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) relatam que houve um aumento do consumo de etanol do ano 2014 para o 2015, alcançando a cifra de 37,5 % do total consumido em veículos leves (ciclo Otto), isso significa aproximadamente 18 bilhões de litros (13 bilhões registrados em 2014). Além disso, o nível de mistura do etanol anidro na gasolina aumentou de 25% para 27%, isto conduz a uma redução do consumo de gasolina A de 9,22% comparando a 2014, que seria de 33,2 bilhões de litros para 30,2 bilhões de litros (UNICA, 2016).

Numerosos trabalhos têm sido desenvolvidos para tornar a produção de combustível mais eficiente e sustentável. Atualmente, para esta tecnologia de produção, o foco está sendo dado à utilização de biomassa vegetal como matéria-prima, e consequente obtenção do etanol 2G. (FARINAS, 2011). No Brasil, os

avanços nas pesquisas de produção eficiente de etanol de segunda geração começaram em 1999 com o lançamento do Genoma Cana, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os últimos registros dessas pesquisas informam que o colmo e as folhas da cana contêm altos teores de açúcares, em maior proporção para hemiceluloses (50%) do que celuloses (30%), além das pectinas, que representam 10%. Atualmente, os avanços na tecnologia para a produção de etanol de segunda geração estão mais focados na sacarificação da celulose; contudo, menos pesquisas sobre a degradação de hemicelulose, que possui maior dificuldade de degradação, estão sendo feitas. (OLIVEIRA, 2012).

As hemiceluloses ficam entrelaçadas com as celuloses, obstruindo o trabalho das enzimas celulolíticas. É necessário ao menos, quebrar parcialmente a hemicelulose e desestruturá-la para facilitar a ação destas enzimas, e aumentar a eficiência da degradação da celulose (FARINAS, 2011). Além disso, é importante a escolha de espécies de plantas com alto conteúdo de polissacarídeos na PCV, que possam gerar biomassa suficiente com objetivo de produzir etanol.

A cana de açúcar é uma cultura principal no Brasil, o bagaço que é utilizado para gerar etanol de 2º geração, depois de extrair o caldo, contém mais concentração de hemicelulose do que celulose. Nesse processo, o importante é obter açúcar fermentável para as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), como glicose proveniente da degradação da celulose ou de algumas hemiceluloses compostas por monômeros de seis carbonos. Porém, a maioria das hemiceluloses está constituída de pentoses como açúcares principais, por exemplo, as xilanas que são as hemiceluloses mais abundantes, contêm xilose como constituinte principal. O problema está em que estes açúcares de cinco carbonos não são processados por esses microrganismos fermentadores (OLIVEIRA, 2012).

De acordo com dados de pesquisas de projeções futuras, a hidrólise dessas pentoses do bagaço da cana, poderia aumentar em aproximadamente 5 bilhões de litros de etanol a mais do que atualmente tem a produção brasileira, que segundo a UNICA, atingiu 27,28 bilhões de litros na safra 2014/2015. A utilização destas pentoses também poderia resultar na obtenção de outros bioprodutos alimentícios, biotecnológicos e medicinais, provocando maior interesse no aproveitamento do bagaço e agregando valor comercial a este subproduto (OLIVEIRA, 2012).

Segue abaixo, o processo da obtenção de etanol de segunda geração (FIGURA 1).

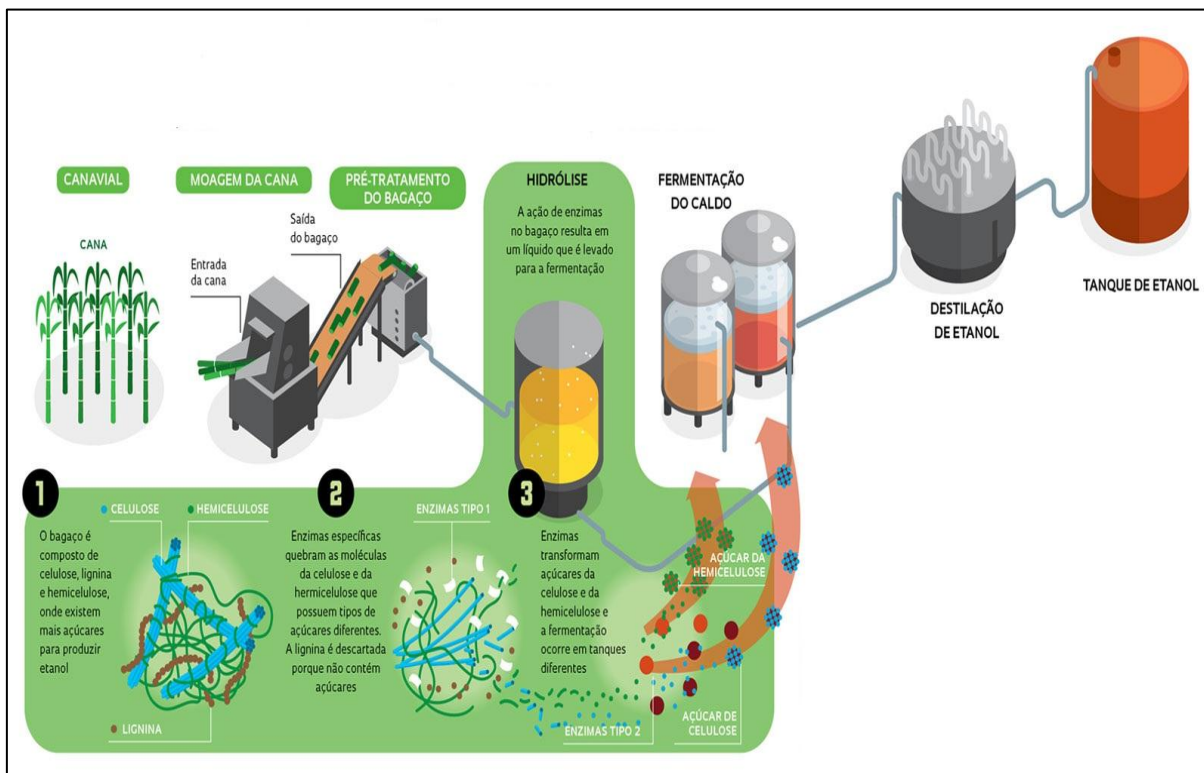


FIGURA 1. Fluxograma do processo de obtenção do etanol de 2ª geração. A matéria prima (cana-de-açúcar) é submetida a um pré-tratamento físico antes de passar para o tanque de hidrólise. Dentro do tanque podemos observar 1) a composição do bagaço, principalmente de polissacáridos principais (celulose e hemicelulose), 2) a ação das enzimas que quebram estas moléculas e 3) a liberação de diferentes tipos de açúcares (hexoses e pentoses) que irão para os tanques de fermentação, onde os microrganismos os converterão em etanol. Finalmente, o etanol é destilado (etanol anidro) e utilizado como combustível principalmente (OLIVEIRA, 2012).

Geralmente, nas biorrefinarias não são aproveitados os resíduos lignocelulolíticos derivados da produção de plantas *commodities*; esses resíduos são uma excelente alternativa para a obtenção de biomassa, visando à produção de biocombustíveis, apoiando uma economia mais verde e sustentável.

Atualmente, existe um grande interesse no desenvolvimento de tecnologias focadas na obtenção de biocombustíveis e outros produtos de importância econômica a partir de biomassa vegetal; portanto, são várias as pesquisas direcionadas para esses objetivos. A parede celular vegetal é o componente típico das células eucarióticas vegetais, onde é acumulada a maior parte do carbono fixado na fotossíntese, por isso, é considerado a fonte mais abundante de biomassa terrestre. Por estes motivos, o estudo da parede celular vegetal tem muita

relevância, especialmente quando tais conhecimentos podem ser aplicados para pesquisas nas áreas de biologia molecular e biotecnologia (FARINAS, 2011).

## **2.3 PAREDE CELULAR VEGETAL (PCV)**

A Parede celular vegetal (PCV) é composta principalmente por polissacarídeos, que consistem 90% do peso seco da parede; o restante é constituído de proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. O grupo principal consiste em celulose (20–40 %), hemiceluloses (15-25%) e pectinas (~30%), as quais formam uma matriz bem estruturada e dinâmica. Dentro dessa matriz, se encontra impregnada a lignina, um polímero fenólico que dá rigidez à planta (BUCKERIDGE, 2010). Estas concentrações na composição da PCV variam segundo a espécie vegetal, como também os tipos de celulose, hemicelulose, pectinas e ligninas presentes na parede; aliás, dentro da mesma espécie vegetal também podem diferir proporcionalmente as concentrações destes componentes (PAULY; KEEGSTRA, 2010).

Existem dois tipos de PCV: a parede celular primária e a secundária. A primária é formada durante o crescimento celular das plantas e consiste principalmente em celulose, hemicelulose e pectina. A diferença da parede celular primária, é que a secundária começa a se formar depois de haver finalizado o crescimento e cumpre a função de sustentação mecânica da planta. Esta é composta por celulose e hemicelulose, geralmente impregnadas de lignina (TAIZ; ZIEGER, 2002).

### **2.3.1 Celulose**

Wei e colaboradores (2006) explicam claramente, que o principal polissacarídeo que forma parte da PCV é a celulose, um homopolissacarídeo constituído por unidades repetitivas de glicose, unidas entre si por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas com liberação de água resultante da reação. À união de duas moléculas

de glicose denomina-se celobiose, um dissacarídeo que se constitui como a unidade repetitiva da celulose (FIGURA 2).

A celulose possui regiões cristalinas bem organizadas, estabilizadas por pontes de hidrogênio de uniões intra e intermoleculares; também contém regiões amorfas onde as cadeias se posicionam mais desuniformes e randomizadas (FIGURA 3). As uniões entre as pontes de hidrogênio intra e intermoleculares das longas cadeias de celulose conformam as denominadas microfibrilas de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

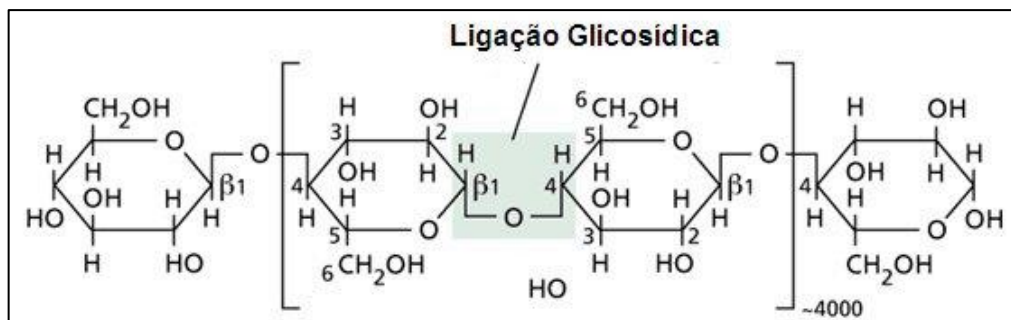


FIGURA 2. Estrutura linear da celulose. União de monômeros repetitivos de glicose e conformação de uma molécula de celobiose através da ligação glicosídica (FARINAS, 2011).

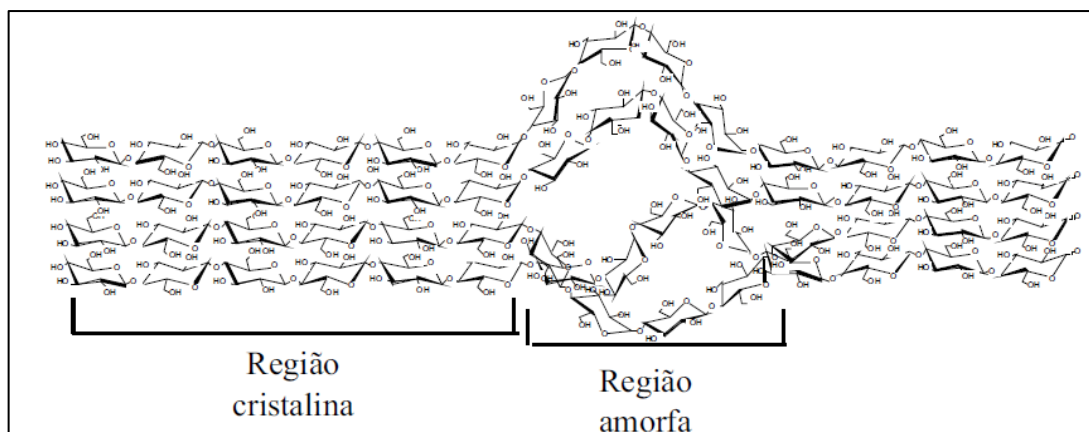


FIGURA 3. Diferentes regiões da celulose. A região cristalina que conforma a parte linear e ordenada da cadeia e a região amorfa, mais desuniforme e randomizada (FARINAS, 2011).

### 2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por diferentes resíduos de açúcares, entre os que se encontram: pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose); complementados também por resíduos de ácido urônico e grupos acetila. A cadeia linear está formada por resíduos de um tipo de açúcar específico, as quais estão ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas; a partir dessa cadeia se formam as ramificações laterais dos outros grupos de compostos (FIGURA 4). As hemiceluloses mais comuns encontradas nas plantas são as xiloglucanas (a mais abundante em dicotiledôneas), as xilanas (maior proporção nas paredes celulares de gramíneas) e os mananas (nas sementes), cujas cadeias lineares estão formadas por glicose, xilose e manose, respectivamente. Todos estes tipos de hemiceluloses contêm cadeias laterais compostas de diferentes monossacarídeos e outros compostos (BUCKERIDGE, 2010).

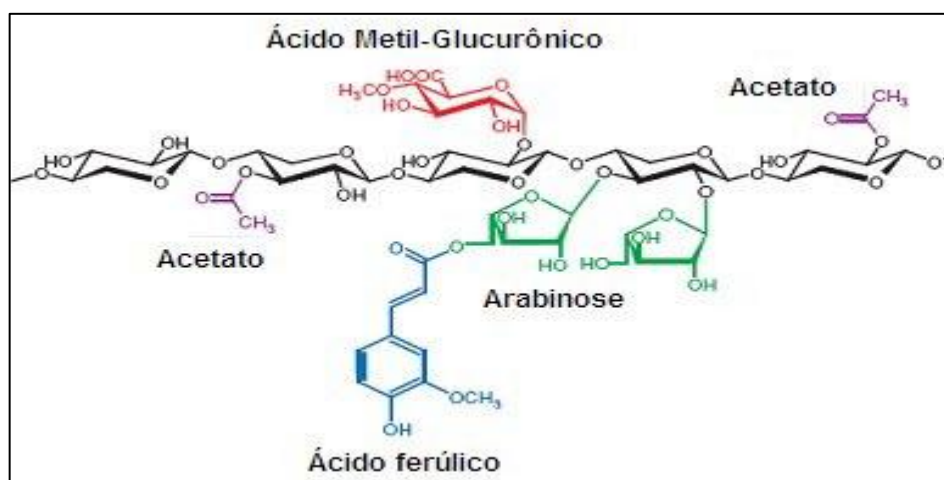


FIGURA 4. Hemicelulose. Cadeia linear formada por polissacarídeos e cadeias laterais de diferentes compostos (FARINAS, 2011).

### 2.3.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática, amorfa e muito complexa, que possui a função de transporte de água, nutrientes e metabólitos na planta, também



protege os tecidos contra o ataque de micro-organismos e fornece suporte mecânico à planta (FENGEL e WEGENER, 1984). A lignina é um dos constituintes principais da PCV secundária e da lamela média (OLIVEIRA, 2001).

Existe um grande interesse científico e econômico focado à lignina, mas a sua estrutura complexa e diversificada dificulta na pesquisa de enzimas que possam degradá-las. A estrutura desta molécula pode variar entre espécies vegetais, até mesmo dentro de uma determinada espécie, variando de acordo a região, solo e clima. Além disso, essa estrutura pode ser modificada quando a lignina é isolada da parede celular (MORAIS 1987, 1992).

## 2.4 DEGRADAÇÃO DA PCV

Existem vários estudos realizados na procura de aperfeiçoar os métodos para degradar a biomassa lignocelulósica. Alguns exemplos são a explosão a vapor (LASER *et al.*, 2002), o emprego de ácidos como ácido sulfúrico (AGUILAR *et al.*, 2002), ácido clorídrico (SPRINGER, 1966), ácido nítrico (RODRÍGUEZ-CHONG *et al.*, 2004) ácido fluorídrico, ácido fosfórico (MARTÍNEZ *et al.*, 2002) ou hidrólise alcalina com NaOH ou amônia (KURAKAKE *et al.*, 2001). Contudo, a hidrólise ácida apresenta muitas desvantagens e danos, já que a utilização de ácidos causa a corrosão de equipamentos. Isto que requer altos investimentos em equipamentos resistentes à corrosão; apresenta alto gasto energético com o processo e com etapas de recuperação do ácido; e gera compostos tóxicos para o meio ambiente, liberados a partir de processos de desidratação de hexoses (hidroximetilfurfural) e de pentoses (furfural) (LEVANON, 2003). Além de serem contaminantes para o meio ambiente, estes furanos são nocivos para os microrganismos fermentadores, já que afetam as atividades enzimáticas e biológicas, rompem as cadeias de DNA, inibindo a transcrição de RNA e síntese de proteínas (SANCHEZ e BAUTISTA, 1988; MODING *et al.*, 2002).

O emprego de enzimas lignocelulósicas é o método mais promissor para ser utilizado na destruição da PCV (GÍRIO *et al.*, 2010), entre alguns benefícios que cabem destacar se encontram: o uso de uma tecnologia limpa e sustentável graças à eficiente capacidade de conversão; aplicação de sistemas mais econômicos e

moderados nas indústrias, como reações a baixas temperaturas e pH neutro; aproveitamento dos resíduos agrícolas e de biorrefinarias; o uso de reagentes biodegradáveis e não tóxicos (BON e FERRARA, 2007).

A transformação de biomassa em biocombustível pelo método biológico geralmente inclui: pré-tratamento da biomassa, produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, fermentação dos açúcares a etanol e destilação do produto final. O pré-tratamento da biomassa é o processo que separa a celulose da lignina, molécula que impede a hidrólise (FAPESP, 2012). Nos últimos 30 anos, diversos métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, incluindo processos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (TABELA 1), porém, o pré-tratamento é um dos processos mais custosos e que ainda precisa ser mais estudado na procura por outras tecnologias mais avançadas e eficientes (ALVIRA *et al.*, 2010).

TABELA 1- DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA O BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

<b>Tipo de pré-tratamento</b>	<b>Reagente</b>	<b>Condições</b>	<b><math>\eta</math> glicose (%)</b>	<b>Referência</b>
Explosão a vapor	SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min	86,3 (72h)	Sendelius, 2005
Alcalino	NaOH	10% NaOH, 90 °C, 1 h	56,23 (120h)	Zhao et al., 2009
AFEX	amônia	120 °C, 30 min, 2:1 amônia: biomassa	70 (72h)	Krishnan et al., 2010
Ácido diluído	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	130 °C, 15 min, 0,5% (wt)	41,5 (72h)	Rueda et al., 2010
Steam-pretreated	SO <sub>2</sub> / sem reagente	190 °C, 5 min / 200 °C, 10 min	80 (24h) 45 (24h)	Carrasco et al., 2010
Explosão a vapor	CO <sub>2</sub>	205 °C, 15 min	86,6 (96h)	Ferreira-Leitão et al., 2010
	SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min	79,7 (96h)	

TABELA 1 - DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA O BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR – CONTINUAÇÃO

<b>Tipo de pré-tratamento</b>	<b>Reagente</b>	<b>Condições</b>	<b><math>\eta</math> glicose (%)</b>	<b>Referência</b>
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2% de peróxido, 60 °C e 16 h	63 (?h)	Monte et al., 2011
Ácido diluído e Organosolv	NaOH 30% (v/v) etanol, NaOH	195 °C, 60 min	43,2 (24h)	Mesa et al., 2011
Ácido diluído	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1 kg:10 L (sólido:líquido)	76 (72h)	Rocha et al., 2011
	[Emim][Ac]	120 °C, 120 min, 5% sólido	98,2 (48h)	
Líquidos Iônicos	[Bmim][Cl]	120 °C, 120 min, 5% sólido	38,6 (48h)	Silva et al., 2011
	[Amim][Cl]	sólido	43,3 (48h)	
	[Mmim][DEP]	120 °C, 120 min, 5% sólido	61,9 (48h)	
Líquidos Iônicos	[Emim][Ac]	145 °C, 14 min, 14% sólido	69,7(total) (?h)	Yoon et al., 2012
Moinho de bolas -	-	400 rpm, 60 min	78,7 (72h)	Silva et al., 2010
WDM	-	1800 rpm, 20 ciclos	49,3 (72h)	Silva et al., 2010
Ozonólise	ozônio		41,79 (24h)	Travaini et al., 2013
Ozonólise + WDM	ozônio	60 min de ozonólise, 4 ciclos e 1,2 min.g-1 de WDM	89,67 (72h)	Barros et al., 2013
WDM + Ozonólise	ozônio	4 ciclos, 0,2 min.g-1 de WDM e 60 min de ozonólise	81,1 (72h)	
LHW	-	190 °C, 18,41 min, 12,5% (v/v)	100 (72h)	Santos et al., 2014

Um dos métodos mais promissores é o emprego de líquidos iônicos, substâncias líquidas que consistem em cátions e ânions, definidos como sais cujo ponto de fusão é menor do que 100°C, sendo muitos deles líquidos a temperatura ambiente (FENG *et al.*, 2010). Os líquidos iônicos possuem capacidade de dissolver o material lignocelulósico, extrair eficientemente a lignina e desestruturar os componentes que constituem a biomassa vegetal (LEE *et al.*, 2009). Estudos relatam que utilizando este material como o pré-tratamento, pode-se atingir um rendimento de 100% na conversão da celulose a glicose, além de diminuir em grande medida o tempo da hidrólise enzimática (SILVA, 2013). Li e colaboradores (2010) reportaram que, tratando a gramínea *Panicum virgatum* com líquidos iônicos antes da hidrólise enzimática, se obteve um rendimento de 90% na sacarificação em um tempo de 12 h, comparando com um 80% e 72 h do mesmo material pré-tratado com ácido diluído (LI *et al.*, 2010). Mesmo que a utilização desses reagentes evidencie estas vantagens frente a outros compostos, não é rentável quando vão ser empregados em larga escala, já que os líquidos iônicos são adicionados como solventes ao invés de um aditivo químico, ou seja, é necessária uma quantidade excessiva para pouca quantidade de biomassa (MORA-PALE *et al.*, 2011). Não obstante, esta tecnologia precisa amadurecer com o desenvolvimento de mais pesquisas direcionadas à produtividade. Os conhecimentos sobre a fração mínima de líquidos iônicos para agir efetivamente na biomassa é ainda escasso (SILVA, 2013).

Depois do pré-tratamento, o material lignocelulósico é submetido à hidrólises enzimáticas, que darão como resultado a liberação de moléculas de glicose, utilizadas pelos microrganismos fermentadores para dar lugar ao etanol. A lignina separada no pré-tratamento pode ser queimada junto ao resto de bagaço sobrando depois da hidrólise para gerar energia elétrica e usada como fonte de energia. O mesmo pode ser feito com o resíduo sólido que sobra após a hidrólise (FAPESP, 2012).

## 2.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA PCV

Muitas enzimas celulolíticas que participam na sacarificação da PCV, são classificadas com base na similaridade das sequências de DNA e comparações feitas no banco de dados denominado Carbohydrate-Active EnZymes (Cazy) (CANTAREL *et al.*, 2009). A família de glicosil hidrolases (GHs) contém o maior número de enzimas que formam parte do processo da degradação da parede. Estudos recentes confirmam que 44 das 115 famílias de GHs participam desse processo, 41 dessas 44 já foram caracterizadas estruturalmente por cristalografia (GILBERT, 2010). A seguir, se abordarão as enzimas mais importantes que intervêm na degradação da parede, até a obtenção de açúcares fermentáveis utilizados pelos microrganismos industriais como fonte de alimento, na cadeia produtiva para a obtenção de biocombustíveis.

### 2.5.1 Celulases

As celulases são enzimas que geralmente possuem alto peso molecular. A maior parte se apresenta glicosilada, podendo variar no conteúdo de carboidratos de 1% até 50%. Tais enzimas estão conformadas por três regiões principais: o domínio catalítico (DC), que contém 90% dos aminoácidos da sequência peptídica, portanto é a região própria da reação catalítica; a região de ligação (RL), com baixa quantidade de aminoácidos, porém, em sua maioria estão glicosiladas, e tem como função anexar a primeira região à terceira, a qual corresponde ao módulo de ligação a carboidratos (MLC). Este sítio permite manter a enzima ligada ao substrato, aumentar a especificidade entre as duas moléculas e quebrar interações químicas de cadeias muito cristalizadas do substrato (CASTRO, 2006).

São necessárias pelo menos três enzimas principais para quebrar essas ligações até atingir a degradação completa da celulose: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e celobiasas, também chamadas  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (WEI *et al.*, 2006). Segue o processo sinérgico da ação destas três enzimas principais sobre a celulose (FIGURA 5).

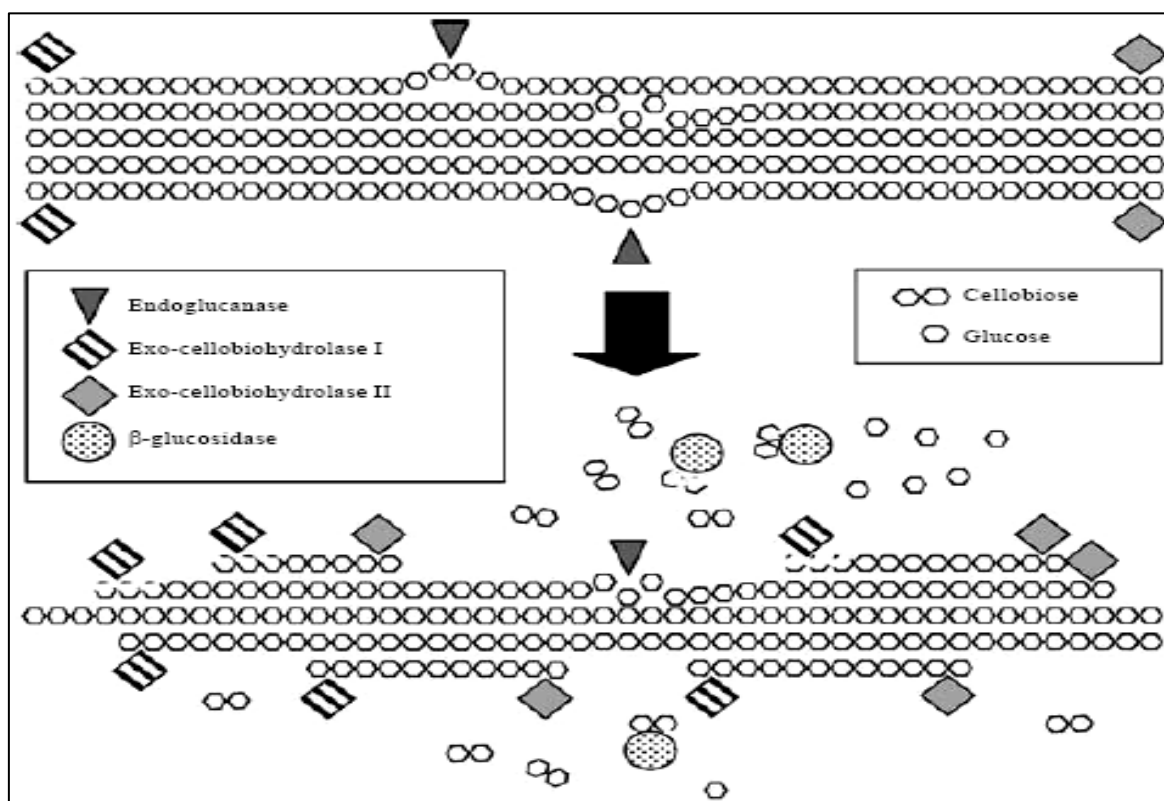


FIGURA 5. Completa degradação da celulose até a obtenção de glicose. Ataque das endoglucanases nas regiões mais superficiais e amorfas, as exoglucanases de Tipo I agindo nos extremos redutores e as de Tipo II nos extremos não redutores, finalmente as celobiasas hidrolisando moléculas de celobiose até liberar glicose (CARVALHO, 2009).

As endoglucanases, denominadas 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanoidrolases por seu nome sistemático, segundo a IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology - são as primeiras enzimas a começar a digestão da celulose. Elas agem na região randômica da cadeia, produzindo hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 intramoleculares, diminuindo o grau de polimerização e deixando exposta a região cristalina da celulose. As exoglucanases são ativas na região cristalina liberando celobiose desde os extremos terminais (ZHANG *et al.*, 2006). Existem dois tipos de exoglucanases: as que clivam os extremos redutores e as que clivam os extremos não redutores (BARR *et al.*, 1996). Finalmente, as  $\beta$ -glucosidases permitem a liberação de monômeros de glicose depois de hidrolisar moléculas de celobiose e outros oligossacarídeos pequenos (ZHANG *et al.*, 2006). As exoglucanases e as celobiasas são inibidas por seus próprios produtos de hidrólise: celobiose e glicose, respectivamente (LYND *et al.*, 2002).

### 2.5.2 Hemicelulases

A xilana é o polissacarídeo mais abundante depois da celulose. Depois da sua degradação completa até a obtenção de pentoses, principalmente xilose e arabinose, estes monossacarídeos entram na via das pentoses fosfato para depois dar lugar aos açúcares fermentáveis utilizados na produção de etanol e outros bioprodutos (DODD e CANN, 2009).

Como as hemiceluloses possuem diferentes polissacarídeos na sua composição, é necessária a participação de várias enzimas que trabalham de maneira coordenada para degradá-las. Tais enzimas trabalham sobre a cadeia linear (endo-1,4- $\beta$ -xilanases e  $\beta$ -D-xilosidases) e sobre as cadeias laterais ( $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\alpha$ -glicuronidases, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases). As endoxilanases clivam a xilana uma vez livre de cadeias laterais. As xilosidases podem hidrolisar a partir dos extremos da xilana ou de xilo-oligossacarídeos como também as unidades de xilobiose (duas moléculas de xilose), que resulta na obtenção da pentose. Segue o esquema (FIGURA 6) do processo degradação da xilana por ação destas enzimas, visando à produção de etanol (DODD e CANN, 2009).

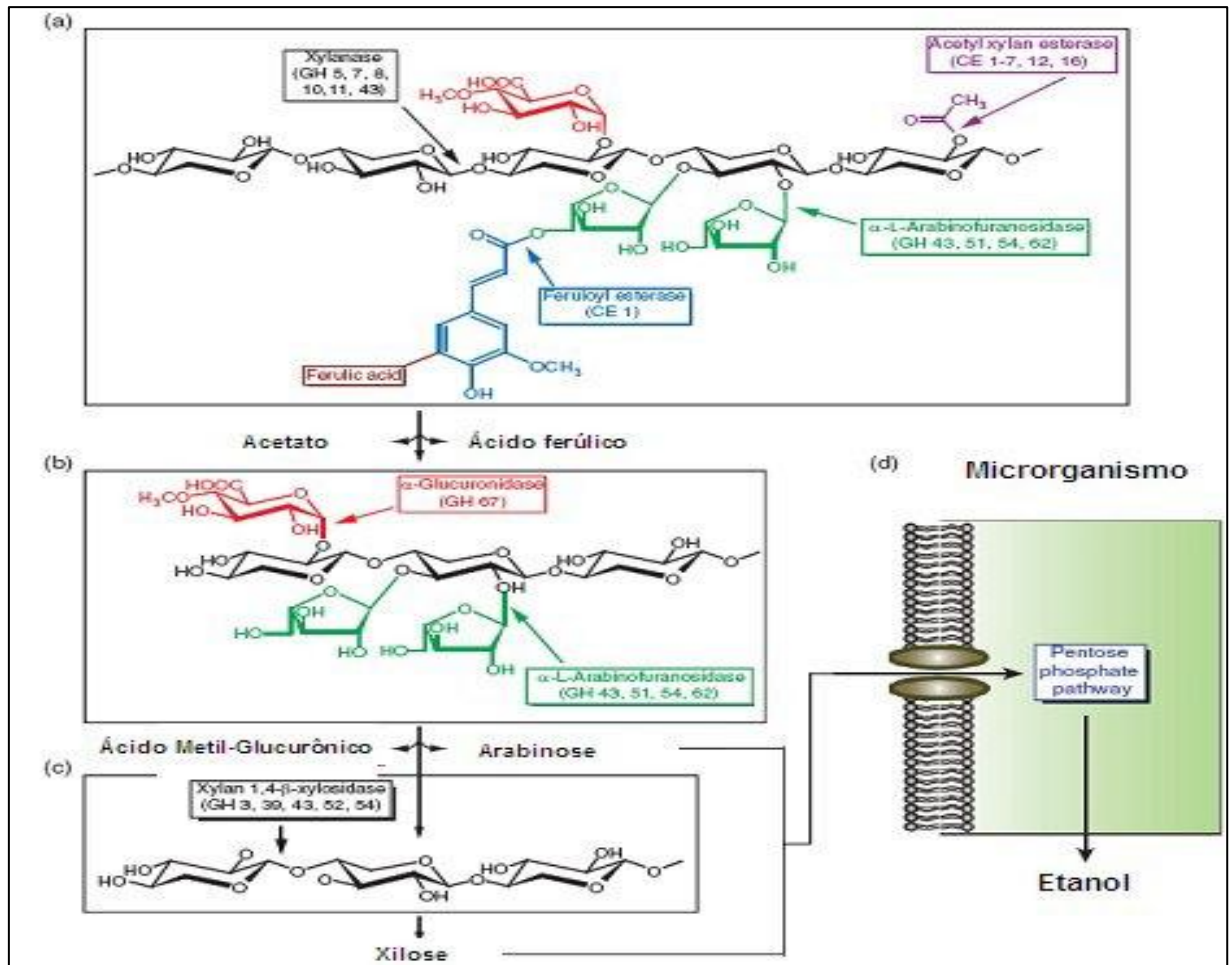


FIGURA 6. Representação do processo de degradação da xilana através das enzimas xilanolíticas, para a subsequente produção de etanol. (a) a ação das xilanases, acetil-xilana-esterases e feruloil-esterases para dar lugar a xilo-oligossacarídeos e, posteriormente, ao ácido ferúlico junto com o ácido acético. (b) Depois, as Arabinofuranosidas e glucuronidas agem sobre esses xilo-oligossacarídeos e liberam arabinose e ácido glucurônico. (c) As xilobioses e os xilo-oligossacarídeos livres de cadeias laterais, são hidrolisados por ação de xilosidas, que liberam o produto final: xilose. (d) Através da via das pentoses fosfato, a xilose e a arabinose são transformados em açúcares fermentáveis e utilizados pelos microrganismos que os convertem em etanol (FARINAS, 2011).

## 2.6 XILOSE PARA PRODUZIR ETANOL

As xiloses são as pentoses mais abundantes na PCV e, conseqüentemente, na biomassa vegetal, além de serem as pentoses mais utilizadas industrialmente. A hidrólise das xiloses até atingir açúcares fermentáveis poderá ajudar no avanço de tecnologias para produção de etanol de segunda geração e aumentará a eficiência produtiva. Uma tecnologia eficiente para transformar a xilose em etanol, se converteria na melhor opção para a eliminação de resíduos agrícolas, uma



alternativa que trará benefícios econômicos e ambientais (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2001).

Para a sua conversão para etanol (FIGURA 7), primeiramente a xilose é reduzida a xilitol, uma reação que ocorre por meio da enzima xilose-redutase (XR). O produto da reação é oxidado a xilulose por ação da xilitol-desidrogenase. A xilulose é fosforilada para dar lugar à xilulose 5-fosfato pela enzima xilulocinase; sucessivamente, este produto ingressa na via das pentoses fosfato (GONG *et al.*, 1981).

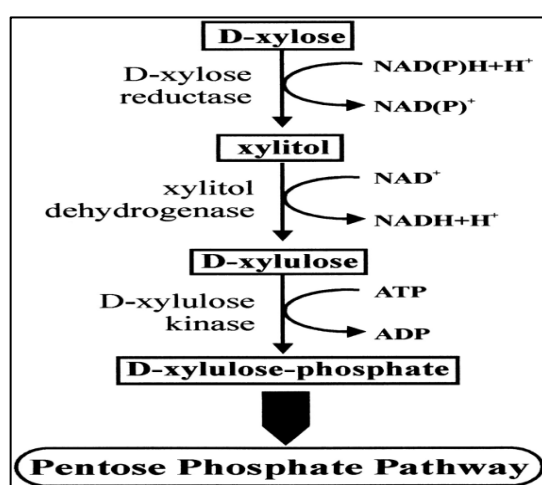


FIGURA 7. Degradação de uma D-Xilose. Conversão da xilose em xilulose-fosfato para entrar na via das pentoses fosfato (SEIBOTH *et al.*, 2003).

A via das pentoses fosfato (PPP), assim como a glicólise, tem a função de degradar a glicose, dando como resultados dois produtos importantes: ribose-5-fosfato e NADPH. Esta via apresenta uma etapa inicial que inclui uma fase oxidativa e outra fase subsequente não-oxidativa (BERG, 2011). Na primeira fase, a glicose-6 fosfato atravessa uma série de reações catalíticas que a transformam em ribulose-5-fosfato (FIGURA 8), que seguidamente se converte em ribose-5-fosfato ou em xilulose-5-fosfato por meio das enzimas isomerases e epimerases, respectivamente. Neste processo, correspondente à fase não-oxidativa, essas pentoses entram em um ciclo de etapas reversíveis para regenerar novamente glicose-6-fosfato e continuar suprindo NADPH às células do organismo. Durante o ciclo, as reações liberam produtos que podem ser aproveitados para diferentes funções, que são

catalisadas por transquetolases, transcetolases e transaldolases (FIGURA 9) (BERG, 2011).

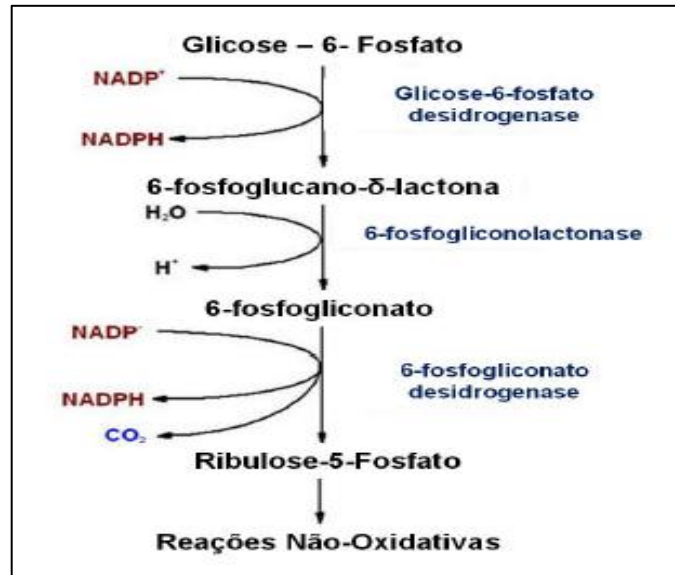


FIGURA 8. Fase oxidativa, primeira etapa da via das pentoses fosfato (PPP). A Glicose-6-fosfato é convertida a ribulose-5-fosfato que ingressa à fase não oxidativa, a seguinte etapa da PPP. Adaptado de Lehninger, 2006.

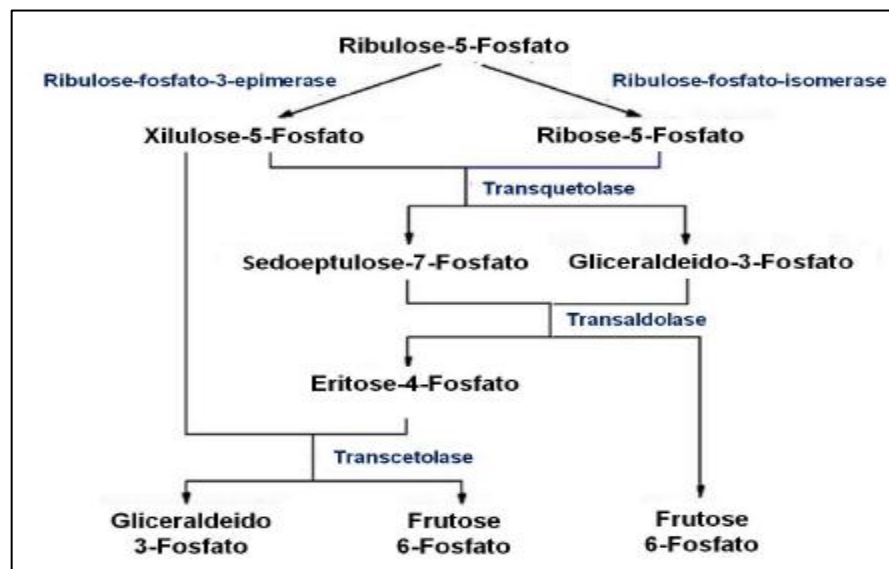


FIGURA 9. Fase não oxidativa. Etapa final da via das pentoses fosfato (PPP). A Ribulose-5-fosfato pode reagir com uma isomerase ou uma epimerase e se transformar em ribose-5-fosfato ou em xilulose-5-fosfato, ambos produtos podem ser convertidos a frutose-6-fosfato pela ação de enzimas como transquetolases, transcetolases e transaldolases, que catalisam reações entre dois subprodutos derivados de estes substratos iniciais. Adaptado de Lehninger, 2006.

Existem microrganismos selvagens capazes de fermentar pentoses, os mais comuns utilizados nas indústrias são algumas leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*, e bactérias como *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Thermoanaerobacter* e *Erwinia* (MILLATI *et al.*, 2005). Também é importante mencionar alguns estudos que respaldam o emprego de alguns microrganismos geneticamente modificados com esse fim: *Saccharomyces cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2001), *Klebsiella oxytoca* (ZHOU, 2001; WOOD, 1992), *Escherichia coli* (OHTA *et al.*, 1991) e *Zymomonas mobilis* (MOHAGHEGHI *et al.*, 2004).

No metabolismo da xilose em microrganismos (FIGURA 10) as bactérias e alguns eucariotos utilizam a enzima xilose isomerase para converter a xilose em xilulose, que posteriormente é fosforilada a xilulose-5-fosfato para entrar na via PPP, da qual se obtém como produto final frutose-6-fosfato. Este açúcar resultante pode ingressar na via da glicólise para ser transformada em piruvato, composto de três carbonos utilizado na fermentação anaeróbica e consequente produção de etanol. Por outro lado, algumas leveduras e fungos não possuem xilose isomerase, porém, catalizam a xilose primeiramente com a ajuda da enzima xilose-redutase para produzir xilitol, que logo é convertido em xilulose por meio da enzima xilitol desidrogenase. Esta xilulose continua normalmente a via como no primeiro caso (JACKSON e NICOLSON, 2002).

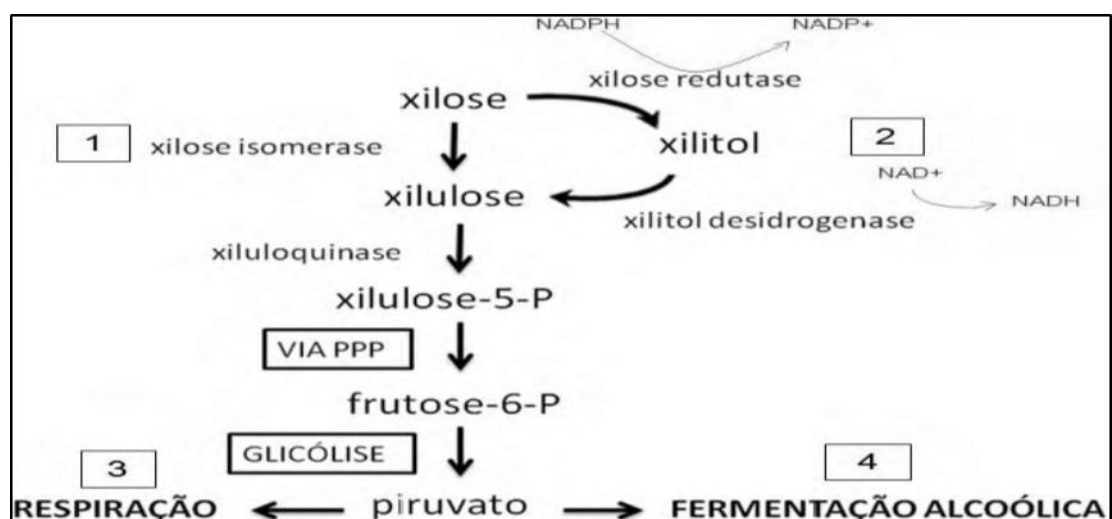


FIGURA 10. Vias metabólicas para o catabolismo da xilose: (1) etapas seguidas pela maioria das bactérias (2) etapas seguidas por alguns fungos e leveduras, (3) oxidação que pode acontecer em todos os organismos e (4) fermentação a etanol. Adaptação de Jackson e Nicolson, 2002.

### 2.6.1 Xilose-redutase (XR)

As xilose-redutases são enzimas oxirredutases dependentes de NADH ou NADPH para converter a xilose em xilitol. Na maioria dos casos, estas enzimas utilizam NADPH, mas existem evidências de que podem ser específicas tanto por NADPH como por NADH (HACKER *et al.*, 1999; MAYR *et al.*, 2000; NEUHAUSER *et al.*, 1997; VERDUYN *et al.*, 1985) ou por NADH, preferencialmente (LEE *et al.*, 2003).

Estas oxirredutases pertencem à superfamília Aldo-ceto redutase (AKR), um grupo muito amplo que inclui 15 famílias e muitas subfamílias, formam parte do metabolismo de numerosas classes de plantas, animais e procariontes. Estas enzimas estão classificadas de acordo com as similaridades entre as sequências proteicas que definem as funções bioquímicas e fisiológicas do organismo, tais como: as hidroxisteróide desidrogenases formam parte da família AKR1 (AKR1), as xilose/manose-redutases se encontram na AKR2 (JIN *et al.*, 2007).

Depois da conversão de xilose em xilitol por meio da XR, o xilitol é oxidado pela xilitol desidrogenase para produzir xilulose, utilizando  $\text{NAD}^+$  como aceptor de elétrons. É desejável uma xilose-redutase potencialmente ativa, que possua maior preferência por NADH que NADPH; podendo aproveitar esse co-substrato liberado da oxidação do xilitol, desencadeando uma via eficiente de alto fluxo que aperfeiçoará as subseqüentes reações (OSTERGAARD *et al.*, 2000).

Muitos pesquisadores estão focando o interesse pela XR, uma enzima utilizada nas indústrias tanto para produzir etanol como xilitol, um adoçante natural baixo em calorias com propriedades anticancerígenas. Uma XR com alta atividade e de fácil obtenção é preferida para esses fins produtivos. Trabalhos anteriores destacam que para uma produção mais econômica de xilitol, é necessário um acoplamento da enzima com o sistema de regeneração do cofactor (NIDETZKY *et al.*, 1996 e 1998). O xilitol vem ganhando muita relevância por suas excelentes características como adoçante natural. Ele é igualmente doce como a sacarose, contudo pode ser utilizado para dietas por ser muito menos calórico e para diabéticos, já que não atravessa o ciclo da insulina no organismo humano (HUANG *et al.*, 2011).

## 2.7 FONTE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Vários estudos afirmam que alguns organismos podem sobreviver alimentando-se de material lignocelulósico graças ao coquetel enzimático que desenvolvem. Existem evidências de bactérias, fungos e protistas que possuem enzimas lignocelulósicas, além de uma ampla porcentagem de animais invertebrados e uns poucos vertebrados que podem degradar celulose com ajuda dos simbiossomas do intestino (HENRISSAT *et al.*, 1985; BEGUIN e AUBERT, 1994, mencionados em WEI *et al.*, 2006; WATANABE e TOKUDA, 2010).

É necessária a busca de novas enzimas com alto potencial catalítico para a correta degradação da biomassa vegetal. O sistema digestivo dos insetos vem sendo alvo de muitas pesquisas para a caracterização deste tipo de enzimas, pois a maioria desses organismos consegue digerir eficientemente a parede celular vegetal, material lignocelulósico dos vegetais (WATANABE e TOKUDA, 2010).

São muitas as referências que determinam as enzimas celulolíticas provenientes de microrganismos simbióticos, que habitam no intestino dos insetos. Porém também existem pesquisas sobre a descoberta de várias enzimas endógenas, produzidas por um mecanismo independente da simbiose, ou seja, produzidas pelo próprio inseto (CALDERÓN-CORTÉS *et al.*, 2012). A primeira enzima celulolítica endógena descoberta, foi em 1998, no cupim *Reticulitermes speratus*, que demonstrou sobreviver alimentando-se de madeira mesmo com a eliminação dos microrganismos que formam parte do seu intestino (WATANABE *et al.*, 1998).

Uma importante quantidade de enzimas endógenas capazes de degradar a PCV são celulasas correspondentes à família GH9, distribuída em varias ordens de insetos. Este grupo de enzimas difere em grande medida quando tem suas sequencias e estruturas comparadas com outras celulasas de microrganismos simbiossomas. Este fato levanta a hipótese de que estas enzimas endógenas provém de um ancestral comum entre os invertebrados, já que estão amplamente distribuídas entre os insetos, sendo possível que tenha ocorrido a transferência vertical para estes genes (FISCHER *et al.*, 2013). Pelo contrário, as celulasas pertencentes às famílias GH5 e GH45 tem sido encontradas apenas em coleópteros (FISCHER *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2005), além diferirem

estruturalmente das GH9. Ainda não existe uma certeza do mecanismo de herança das GH5 e GH45, se foi através de um ancestral comum entre os coleópteros ou por transferência horizontal a partir de outros organismos mais distantes filogeneticamente (tem celulasas destas famílias encontradas artrópodos, nematoides e moluscos); são necessários mais projetos de sequenciamento e caracterização destas enzimas para chegar a conclusões mais exatas (FISCHER *et al.*, 2013).

Várias enzimas endógenas de insetos foram descobertas e avaliadas através da disponibilidade de dados genômicos, como as bibliotecas de cDNA e EST (Expressed sequence tag). Os avanços nos projetos de transcritomas de diferentes insetos tem permitido analisar uma grande quantidade de genes com atividade envolvida na degradação da parede celular. Através desses avanços, é possível o estudo e a comparação de genes no banco de dados, para obter uma prospecção de enzimas endógenas no intestino do inseto (WILLIS *et al.*, 2010).

O intestino médio é o compartimento do sistema digestivo onde se produzem varias enzimas lignocelulolíticas em alguns insetos e a expressão endógena das mesmas, confirmadas especialmente em alguns coleópteros (GIRARD e JOUANIN, 1999; SCRIVENER *et al.*, 1997; SUGIMURA *et al.*, 2003; WATANABE e TOKUDA, 2001; WEI *et al.*, 2006; MARTIN, 1983; NAKASHIMA *et al.*, 2002; TOKUDA e WATANABE, 2007; ZHOU *et al.*, 2007).

No presente estudo, reportamos a clonagem, expressão e caracterização de dois diferentes genes: o *AgEG1* que codifica uma  $\beta$ -1,4-endoglucanase (EGase), e o *TIXR1* que codifica uma xilose-reductase (XR). Ambos os genes provêm do intestino médio de dois importantes insetos praga: *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro) e de *Trichoplusia ni* (broca-gigante da cana-de-açúcar), respectivamente. Como foi mencionado anteriormente, várias celulasas foram descobertas em coleópteros, principalmente as  $\beta$ -1,4-endoglucanase, que já se encontram registrados no Banco de dados genômico (GenBank). Diferentemente, ainda não foram caracterizadas Xilose-reductases endógenas de insetos em geral; Entretanto, várias AKR de diferentes ordens, entre elas Lepidoptera, já foram identificadas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Clonar e expressar dois genes (*AgEG1* e *TIXR12*) codificadores de enzimas endógenas originárias de insetos, que podem possuir atividade de degradação de biomassa vegetal.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar *contigs*, dentro do banco de dados de transcriptoma de *A. grandis* e de *T. licus licus*, que possuam similaridade com sequências de genes de enzimas que degradam biomassa vegetal;
- Clonar os genes de interesse a partir do cDNA desses insetos;
- Expressar os genes de interesse em sistema heterólogo (*Pichia pastoris*);

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 INSETOS

Diferentes estágios de *Anthonomus grandis* (ovos, larvas e adultos) foram obtidos do laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF; Já espécimes de *Telchin licus* (ovos e lagartas) foram coletados de canaviais da Usina Triunfo, em Boca da Mata-AL e transportados por via aérea. Ambas as espécies de insetos foram levados para o Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, onde foram alimentados com dieta artificial. Para *A. grandis*, a dieta consiste em: 1500 mL de água, 40 g de ágar, 60 g de levedo de cerveja, 100 g de proteína de soja, 60 g de gérmen de trigo, 40 g de pharmedia, 60 g de açúcar, 2 g de nipagin, 2,4 g de ácido sórbico, 10 g de sais minerais, 20 g de ácido ascórbico e 10 mL de solução vitamínica. Para *T. licus*, a dieta consistiu em: 20 g de caseína, 10 g de extrato de levedura, 60 g de açúcar branco, 10 g de ácido ascórbico, 11 mL de solução vitamínica, 7,5 g de sais de Wesson, 300 mg de colesterol, 300 mg de benzoato de sódio, 80 mg de ampicilina, 800.000 UI de nistatina, 2 mL de cloreto de colina (50%) e 800 mL de água. Os insetos foram mantidos a  $26 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 horas. Para a expressão gênica das enzimas de interesse, os insetos foram alimentados com cana de açúcar e avaliados durante todos os estágios do ciclo de vida (ovo, lagarta, pupa e adultos de ambos os sexos).

### 4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Foram escolhidos dois genes de sequência completa que codificam as enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanase e Xilose-Redutase, com base no banco de dados próprio: transcritomas do intestino de *A. grandis* e de *T. licus*, respectivamente



(Firmino *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2015). Para a obtenção destes genes, foi isolado o RNA total do intestino médio de ambos os insetos, na fase larval de terceiro instar.

Essa região do intestino, previamente dissecada, foi triturada em N<sub>2</sub> líquido utilizando almofariz e pistilo. Para homogeneizar as amostras foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies™) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 2U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences™) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com instruções do fabricante. O material foi purificado e extraído utilizando o kit RNeasy (QIAGEN), posteriormente o produto foi avaliado em gel de agarose 1,5%. A concentração de RNA foi estimada em espectrofotômetro NanoVue (GE HealthCare). Os cDNAs foram sintetizados utilizando 2µg de RNA total. Foi utilizado o kit Superscript II TM First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), e o oligonucleotídeo NV-d(T)30-AP.

#### 4.3 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS GENES *AgEG1* E *TIXR1*

Para a amplificação dos genes em questão a partir do cDNA total do insetos, foram desenhados os iniciadores (*primers*) e a partir das sequências dos genes encontrados nos transcritomas, utilizando as ferramentas Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e Tm calculator (<https://www.thermofisher.com/us/en/.../tm-calculator.html>). As sequências dos *primers* para cada gene foram denominadas “Forward” (Fwd) para o direto e “Reverso” (Rev) para o reverso (TABELA 2).

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas em dois ciclos: no primeiro foram utilizados os *primers* “Fwd” dos genes e o primer NV-d(T)30-AP como “Rev”. No segundo ciclo foram utilizados os *primers* “Fwd” e “Rev” dos genes.

Foram adicionados 0,3 µL da Taq Polimerase (Ludwig™), 10 µmol de cada primer e 2 µL de cDNA diluído 20 vezes, para cada reação de PCR. O programa do termociclador consistiu em uma condição inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação (30 s a 95°C), anelamento (30 s a 58 °C), extensão (1 min a 72°C), e extensão adicional (5 min a 72°C) para ambos genes. Os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose 1% utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit, (Qiagen). Os produtos purificados foram clonados no plasmídeo pGEM-Teasy

(Promega™), e as construções foram transformadas em *E. coli* OmniMAX™ 2 T1 R. Os transformantes (pGEM-T easy: *AgEG1* e pGEM-T easy: *TIXR1*) foram distribuídos em placas com meio LB (10 g/l tripton, 10 g/l NaCl, 5 g/l de extrato de levedura, 15 g/l de ágar, com pH 7.5) suplementadas com ampicilina (100µg/ml), IPTG 100 mM e X-Gal 50 µg/ml, utilizando o método de seleção “sistema branco-azul”. Os clones positivos foram comprovados por digestão com a enzimas EcoR1 e por sequenciamento dos dois extremos 5' e 3' Em sequenciador automático (ABI 3130xl Genetic Analyzer).

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

NOME	GENE	SEQUÊNCIA	OBJETIVO
<i>AgEG1</i> -Fwd-pGEM	<i>AgEG1</i>	5' - ATGAAAAGCTTTGTGGGTGCC-3'	Clonar o gene no vetor PGEM-T Easy
<i>AgEG1</i> -Rev-pGEM	<i>AgEG1</i>	5' - TTACATATTGTCATTTACACAACCA-3'	Clonar o gene no vetor PGEM-T Easy
<i>TIXR1</i> -Fwd-pGEM	<i>TIXR1</i>	5' - TAAGAATTTCATATGGCGTCGAAAGCGCTTAATGTT-3'	Clonar o gene no vetor PGEM-T Easy
<i>TIXR1</i> -Rev-pGEM	<i>TIXR1</i>	5' - TTAGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGAAATTC ATCATTTTCAAATGGATGGTATTTGTG-3'	Clonar o gene no vetor PGEM-T Easy
<i>AgEG1</i> -Fwd-pGAPZ	<i>AgEG1</i>	5' -TAAGAATTCCACTTAGCGGTTCTGGAACACTACT-3'	Clonar o gene no vetor pGAPZαB
<i>AgEG1</i> -Rev-pGAPZ	<i>AgEG1</i>	5' -TTAGTCGACCATATTGTCATTTACACAACC-3'	Clonar o gene no vetor pGAPZαB
<i>TIXR1</i> -Fwd-pGAPZ	<i>TIXR1</i>	5' - TAAGAATTTCATATGGCGTCGAAAGCGCTTAATGTT-3'	Clonar o gene no vetor pGAPZαB
<i>TIXR1</i> -Rev-pGAPZ	<i>TIXR1</i>	5' - TTAGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGAAATTC ATCATTTTCAAATGGATGGTATTTGTG-3'	Clonar o gene no vetor pGAPZαB

#### 4.4 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISES DE DADOS

As relações filogenéticas das sequências *AgEG1* e *TIXR1* foram realizadas utilizando estas e outras sequências conservadas recuperadas do GenBank – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando as ferramentas de bioinformática “BLASTn” e “BLASTx”. As análises foram feitas com as sequências proteicas dos genes para limitar a busca no grupo de eucariontes da classe Insecta com o fim de encontrar

similaridades filogenéticas com outras enzimas endógenas. As análises evolutivas representadas em árvores filogenéticas, foram realizadas utilizando o software MEGA7, utilizando o método Neighbor-Joining.

As sequências proteicas preditas de *AgEG1* e de *TIXR1* foram obtidas utilizando o ExPASy translate (<http://web.expasy.org/translate/>). O ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (MW) foram preditos mediante a ferramenta pI/MW tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Os software DictyOGlyc 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>) e NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) foram utilizados para determinar os sítios de O- e N-glicosilação, respectivamente. O SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ajudou a determinar possíveis sequências de peptídeo sinal. As clonagens dos genes nos vetores pGEM-T Easy e pGAPZαB, foram apresentadas de forma ilustrativa com ajuda do software SnapGene® 2.3.2 (<http://www.snapgene.com/>).

#### 4.5 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE EXPRESSÃO

As regiões codificadoras dos genes *AgEG1* e *TIXR1*, sem peptídeo sinal, foram amplificadas por PCR usando a Taq Polimerase (Ludwig). Foram utilizados os nucleotídeos iniciadores desenhados com os sítios para as enzimas de restrição (TABELA 1): *EcoRI* e *SalI* para o primeiro gene; *EcoRI* e *NotI* para o segundo gene (todos sublinhados); tais enzimas foram escolhidas utilizando a ferramenta NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), para confirmar que as sequências não possuem os mesmos sítios de restrição utilizados para clonagem.

Os parâmetros para os ciclos da PCR foram os mesmos mencionados anteriormente. O produtos de PCR foram purificados (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) e clonados no vetor pGEM-Teasy (Promega™). As construções obtidas foram transformadas em *E. coli* OmniMAX™. Os plasmídeos (pGEM-T easy:*SalI*-*AgEG1*-*EcoRI* e pGEM-T easy:*NotI*-*TIXR1*-*EcoRI*) foram extraídos de *E. coli* e digeridos com as enzimas de restrição (sítios desenhados nos pares de primers) para liberar os insertos, e confirmar a clonagem. O vetor de expressão pGAPZαB (Invitrogen, USA), foi digerido com *EcoRI* e *SalI* (Promega) para um caso; e *EcoRI*

com *NotI* (Promega) para o outro caso. Com ajuda da T4 ligase obteve-se a ligação dos insertos purificados e o vetor pGAPZαB, para gerar os cassetes de expressão pGAPZαB:*AgEG1* e pGAPZαB:*TIXR1*. Os produtos da ligação foram transformados em *E. coli* OmniMAX™, e os transformantes foram selecionados em placas de meio LB contendo 25µg/ml de Zeocina TM (Invitrogen). Procedeu-se à extração dos plasmídeos (pGAPZαB:*AgEG1* e pGAPZαB:*TIXR1*) de *E. coli*, e a confirmação dos genes por sequenciamento de DNA.

#### 4.6 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Pichia pastoris* E ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO DOS GENES *AgEG1* E *TIXR1*.

Para transformação estável de *P. pastoris* foi utilizado o vetor pGAPZαB para permitir uma expressão constitutiva, utilizando o promotor (PGAP) do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A 6xHis Tag foi adicionado ao *AgEG1* e ao *TIXR1* para facilitar a subsequente purificação das proteínas de interesse. Foram escolhidas duas cepas de *P. pastoris* (SMD1168 H e X33) (Invitrogen), para os testes de expressão. A primeira é uma levedura sem atividade de proteases, que foi selecionada para diminuir o risco da degradação proteolítica das proteínas de interesse. A segunda é uma cepa selvagem com alta eficiência de crescimento e expressão.

Foram utilizados 30 µg de DNA correspondente a (1) pGAPZαB:*AgEG1* e (2) pGAPZαB:*TIXR1*, que foram linearizados com as enzimas de restrição *BglII* e *BspHI*, respectivamente, para facilitar a integração do DNA no cromossomo de *P. pastoris*. As células foram transformadas por eletroporação, utilizando o protocolo da MicroPulser™ Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad™, USA):. As células competentes foram crescidas nas condições de 28°C a 220 rpm, no meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose), até atingir uma densidade de  $5-7 \times 10^7$  células/ml. Após centrifugação, o precipitado de células foi tratado com Tampão HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) (pH 8.0), 1 M com DTT (1,4-Dithiothreitol), 1 M, antes das lavagens com sorbitol (1 M). Quarenta microlitros de células competentes foram adicionadas para cada DNA e foram transferidas para cubetas de 0,2 cm para a eletroporação, utilizando o parâmetro "Pic" (2kV). As células foram incubadas por duas horas a 30°C antes de

ser distribuídas em placas de YPD/sorbitol + ágar e 100 µg/ml de zeocina (Invitrogen), e foram crescidas durante cinco dias a 28°C.

A integração dos genes no cromossomo da levedura foi confirmada por PCR de colônias, utilizando os primers “forward” e “reverse” de cada gene. Foram selecionadas as colônias desenvolvidas após uma semana e foram submetidas a lise celular por repetidos choques-térmicos, consistindo em água em ebulição e nitrogênio líquido. Após centrifugar as células, foram extraídos 2 µl do sobrenadante contendo DNA para ser utilizado nas PCRs.

#### **4.7 MICROEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM *P. pastoris*.**

Foram escolhidos dois transformantes positivos de cada gene, baseando-se na presença de bandas amplificadas na PCR. As colônias selecionadas foram submetidas aos ensaios de microexpressão em meio YPD, com 50 ml de meio em erlenmeyers de 250 ml. Todos os meios de cultura preparados com YPD, líquido e sólido, foram preparados contendo o antibiótico cefotaxima (100 µg/ml), tanto para o meio utilizado no preparo das células competentes, como para os ensaios de expressão e placas contendo ágar. A expressão das proteínas consistiu em deixar crescer as células de levedura até atingir a fase log (5 dias), extraíndo alíquotas de 1 ml a cada 24 horas, para poder analisar a expressão relativa ao tempo. Posteriormente, foram extraídas as proteínas intra e extracelulares.

Para a extração das proteínas intracelulares, foram utilizadas microesferas de vidro para lisar as células, seguindo o protocolo do manual da Invitrogen. Para a extração das proteínas do meio extracelular, o sobrenadante foi separado das células por centrifugação, posteriormente o conteúdo livre de células foi precipitado com 10% ácido tricloroacético (TCA) em acetona, durante 16 horas a -20°C. Uma vez concentradas as proteínas, foram centrifugadas e lavadas três vezes com acetona. Depois de secar e evaporar totalmente a acetona, as proteínas foram ressuspensas em 30 µL de tampão de carregamento amostra contendo SDS.

Quinze microlitros do material ressuspendido foi aplicado em SDS-PAGE 12% para eletroforese com as seguintes condições para a corrida: 10 miliampères (mA) no primeiro gel (5%) e 20 mA no segundo gel (12%). A coloração foi efetuada

submergindo os géis em uma solução com 0,25% de “Coomassie Brilliant Blue G 250”, 45% de metanol e 8% de ácido acético e mantendo-o sob agitação por aproximadamente uma hora. Posteriormente, os géis foram descorados em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, sendo realizadas trocas sucessivas, até ser obtida a transparência desejada. Os géis foram mantidos em água até o próximo uso desejado.

Foi realizado o *Western blotting*, utilizando o anticorpo específico Anti-His (Invitrogen) na concentração 1:3000. Para transferência das proteínas do gel para membrana foi utilizada amperagem de 10 mA durante 20 minutos, e após, a membrana foi incubada com a solução bloqueio durante 16 horas. Posteriormente, a membrana foi incubada com o Anticorpo Anti-His conjugado a Fosfatase Alcalina, por 4 horas. A reação de revelação foi realizada com o Kit Colorimétrico Immun-Blot® AP (Bio-Rad) (Brasileiro e Carneiro, 1998).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *AgEG1* E *TIXR1* NO VETOR pGEM-T Easy

Nos transcritomas dos insetos (*A. grandis* e *T. licus licus*) obtidos pela equipe do Laboratório de Interação Molecular Pranta – Praga (LIMPP) da EMBRAPA Recursos genéticos e Biotecnologia (FIRMINO *et al*, 2013; FONSECA *et al*. 2015), foram encontrados vários “contigs” (sequências montadas) que apresentaram sequências parciais ou totais de genes relacionados com a degradação da biomassa vegetal endógenos de insetos. Sequências de enzimas envolvidas na degradação de biomassa foram procuradas no NCBI e comparadas com sequências semelhantes dos transcritomas. Foram identificados vários contigs e foram escolhidos aqueles com maior score e e-value (dados não mostrados).

Foram confirmadas as sequências completas de dois genes: um semelhante a uma  $\beta$ -1,4, endoglucanase que foi denominada *AgEG1*; e outra com similaridade para uma Aldo-Ceto redutase que hipotetizamos que poderia ter atividade de xilose redutase, e foi denominada então de *TIXR1*. Os resultados do sequenciamento dos genes após a clonagem, são similares aos contigs (FIGURAS 11 e 12), com exceção de algumas bases que foram substituídas por outras em algumas regiões das cadeias, especialmente no gene *TIXR1*, que apresentou mudanças mais evidentes; estas variações ao longo das cadeias de DNA, se deve, provavelmente, a erros no sequenciamento ou a polimorfismos. As PCRs realizadas confirmaram as bandas de 650 pb para *AgEG1* e 990 pb para *TIXR1* (FIGURAS 13 e 14), amplificados a partir de cDNA de intestino da fase larval de ambos os insetos. Os resultados do sequenciamento de DNA também validaram as sequências completas destes genes, após a clonagem no vetor pGEM-T Easy (FIGURAS 15, 16 e 17).

## CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

orf      ATGAAAAGCTTTGTGGGTGCCATTGCGGTTTTATCCGTTGTTGCTGTTGCATATGGTCTT   60
sequenciado ATGAAAAGCTTTGTGGGTGCCATTGCGGTTTTATCCGTTGTTGCTGTTGCATATGGTCTT   60
*****

orf      AGCGGTTCTGGAACCTACCACCCGCTACTGGGATTGCTGCAAGCCATCTTGCTCATGGAAG   120
sequenciado AGCGGTTCTGGAACCTACTACCCGCTACTGGGATTGCTGCAAGCCATCCTGCTCATGGAAG   120
*****

orf      GAAAATGTTGGAACACTGGACCCTGTGGACTCCTGTGCCGCTGATGGTGAAACTAAACTT   180
sequenciado GAAAATGTTGGAACACTGGACCCTGTGGACTCCTGTGCCGCTGATGGTGAAACTAAACTT   180
*****

orf      AATGCTTCAGTAACCTTCTGGATGTGATTTCGGATGGTACTTCCTACGTATGCAACAACCTTG   240
sequenciado GATGCTTCAGTAACCTTCTGGATGTGATTTCGGATGGTACTTCCTACGTATGCAACAACCTTG   240
*****

orf      CAACCCTGGGCTGTTAACGATACTCTTGCAATATGGGTTTCGTAGCCGCTTCTTTCACTGGT   300
sequenciado CAACCCTGGGCTGTTAACGATACTCTTGCAATATGGGTTTCGTAGCCGCTTCTTTCACTGGT   300
*****

orf      GGTGTTGACAACAGCCAATGTTGTGTTTGTGTTTAAAACTTACATTTAAAAATACACTTGCT   360
sequenciado GGTGTTGACAACAGCCAATGTTGTGTTTGTGTTTAAAACTTACATTTAAAAATACACTTGCT   360
*****

orf      GGCAAAACAATGATTGTACAAAACGTTAATACTGGAGGAGACTTAGGATCTAACCAATTC   420
sequenciado GGCAAAATAATGATTGTACAAAACGTTAATACTGGAGGAGACTTAGGATCTAACCAATTC   420
*****

orf      GACATTCAAATCCCGGAGGTGGTGTGGGTATTTTCACCCGCGGTTGCCAAACTCAATGG   480
sequenciado GACATTCAAATCCCGGAGGTGGTGTGGGTATTTTCACCCGCGGTTGCCAAACTCAATGG   480
*****

orf      AATGCTCCAGCTAGCGGTTGGGGTGAGCAATACGGCGGAGTCACTTCCGATGCTGAATGT   540
sequenciado AATGCTCCATCTAGCGGTTGGGGTGAGCAATACGGTGGAGTCACTTCCGATGCTGAATGT   540
*****

orf      GACGAACCTCCCTACAGAACCTTCAATCTGGATGCCACTTTAGATTTGGATGGTATGAAAAC   600
sequenciado GACGAGCTCCCTACAGAACCTTCAAGCTGGATGCCACTTTAGATTTGGATGGTATGAAAAC   600
*****

orf      GCTAATAATCCAGAGGTTGACTTTGAACAAATTACCTGCCCAACTGAACTTACTTCCCTT   660
sequenciado GCTGATAATCCACAGGTTGACTTTGAACAAATTACCTGCCCAACTGAACTTACTTCCCTT   660
*****

orf      ACTGGTTGTGTAATGACAATATGTAA   687
sequenciado ACTGGTTGTGTAATGACAATATGTAA   687
*****

```

FIGURA 11. Alinhamento das sequências clonada e sequenciada com a “fase de leitura aberta” (open reading frame (orf), em inglês), do gene *AgEG1*.



## CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

orf
sequenciado      -----ATGGCGTCGA-AAGCGCTTA-ATGTYAAATTTTATAAT
                  CTCCGAAATATTTAAAGAAATTTTCGCCGTCGAAAAGCGCTTAATTGTTAAATTTTATAAT
                  : * * * * * : * * * * *

orf
sequenciado      GGTATCGAGTGCCCTATCCTCGGAATTGGTACTTGGAAGTCGAAGCCCGGCGAAGTCACT
                  GGTATCGAGTGCCCTATCCTCGGAATTGGTACTTGGAAGTCGAAGCCCGGCGAAGTCATT
                  * * * * *

orf
sequenciado      CAGGCGGTGAAGGACGCCATCGATATTGGCTATCGACACATCGACTGCGCCTTCGTGTAC
                  CAGGCGGTGAAGGACGCCATCGATATTGGCTATCGACACATCGACTGCGCCTTCGTGTAC
                  * * * * *

orf
sequenciado      GGCAACGAGAAGGAGGTGCGGCGAGGCAATCACCAGTAAGATCAGCGAAGGTGTGGTGAAG
                  GGCAACGAGAAGGAGGTGCGGCGAGGCAATCACCAGTAAGATCAGCGAAGGTGTGGTGAAG
                  * * * * *

orf
sequenciado      AGAGAGGATCTATTATCAGTCGAAACTCTGGAACACCTTCCATCGTCCAGATTTARTT
                  AGAGAGGATCTATTATCAGTCGAAACTCTGGAACACCTTCCATCGTCCAGATTTAGTT
                  * * * * *

orf
sequenciado      CGTGGCGCGCTCAACAAAACCTTTAGAGAATTTAACTTGAAATATATAGATCTTTATCTG
                  CGTGGCGCGCTCAACAAAACCTTTAGAGAATTTAACTTGAAATATATAGATCTTTATCTG
                  * * * * *

orf
sequenciado      ATCCATTGGCCGAGGCTTATAAGGAGGAAGGTGAACTCTTCCCTGCGGACGAGTCCGGC
                  ATCCATTGGCCGAGGCTTATAAGGAGGAAGGTGAACTCTTCCCGCGGACGAGTCCGGC
                  * * * * *

orf
sequenciado      AAGATTCTCTTCTCTGACGTGGATTATGTGGACACTTGGAAGGCTCTGGAGCCGTTGGTT
                  AAGATTCTCTTCTCTGACGTGGATTACGTGGACACTTGGAAGGCTCTGGAGCCGTTGGTC
                  * * * * *

orf
sequenciado      GATGAGGGCCTGGTCCGACGTCTCGGTGTGTCCAACCTTCAACTCTAAACAAGTCGACAGG
                  GATGAGGGCCTGGTCCGACGTCTCGGTGTGTCCAACCTTCAACTCTAAACAAGTCGACAGG
                  * * * * *

orf
sequenciado      CTGCTGAAGGAGGTGACGATCAAGCCTGTTGTCAATCAGGTGGAATGTCAC-CCGTATCT
                  CTGCTGAAGGAGGTGACCATCAAGCCTGTTGTCAATCAGGTGGAATGTCACCCCGTATCT
                  * * * * *

orf
sequenciado      CAATCAGAAGCGCCTGAAGGAGTTCTGCGAGTCGCGTGGCGTTAAGATCACC6CGTACTC
                  CAATCAGAAGCGCCTGAAGGAGTTCTGTGAGTCGCGTGGCGTTAAGATCACC6CGTACCT
                  * * * * *

orf
sequenciado      CC--CCCTCGGGTCCCC-GGACAGGCCCTG-GGCGAAACCCGAGGACCC-CCAGCTGAT-
                  CCCCCCTAGGGTCCCCGGGACAGGCCCTGGGGCGAATCCCGATGACCCCCAGCTAATG
                  * * * * *

orf
sequenciado      GGACGACCCTAAACTGAA-GGCAATCGCCGA--CAGACTCGACAAAACC--GTGGCCCAA
                  GGACGACCCTAAACTGAAAGGCAATCGCCCCGAAAGAAGTGCACAAAACCCGTGGGCCCAA
                  * * * * *

orf
sequenciado      GTGTTGATTAGATACC--AGA-TCGACAGCGG-CAACATT--GTG--ATACCGAAATCTG
                  GTGTTGATTAGAATACCCAGATTGGACAGCGGGCAACCATTTGTGAATACCCGA-----
                  * * * * *

orf
sequenciado      TGAACAAATCTCGTATCGCGAGCAACTTCGAGGTGTTGGACTTCAAGCTGTCCCCTGAAG
                  -----

orf
sequenciado      ATGTCCAGCTGATAGACACCTTCGATGTGAACGGCAGATTTCGTACCAATGACC6CTTCCC
                  -----

orf
sequenciado      TCGGCCACAAATACCATCCATTTGAAAATGATGAATTTTAA
                  -----

```

FIGURA 12. Alinhamento das sequências clonada e sequenciada com a “fase de leitura aberta” (open reading frame (orf), em inglês), do gene *TIXR1*.

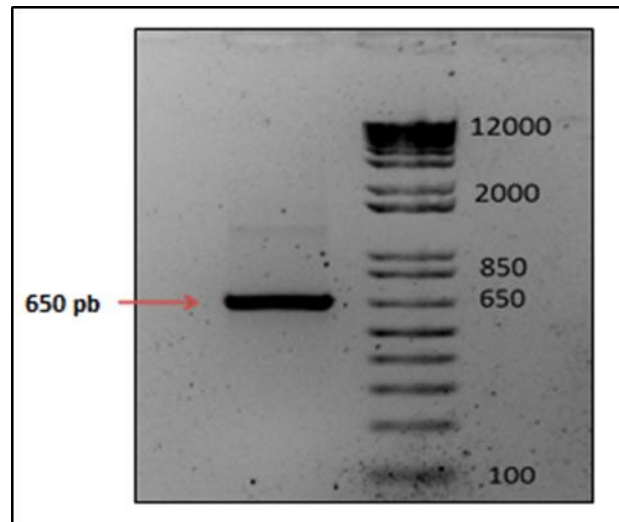


FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação por PCR do gene *AgEG1* (650 pb) que provavelmente codifica uma enzima  $\beta$ -1,4-Endoglucanase, isolado de *A. grandis*.

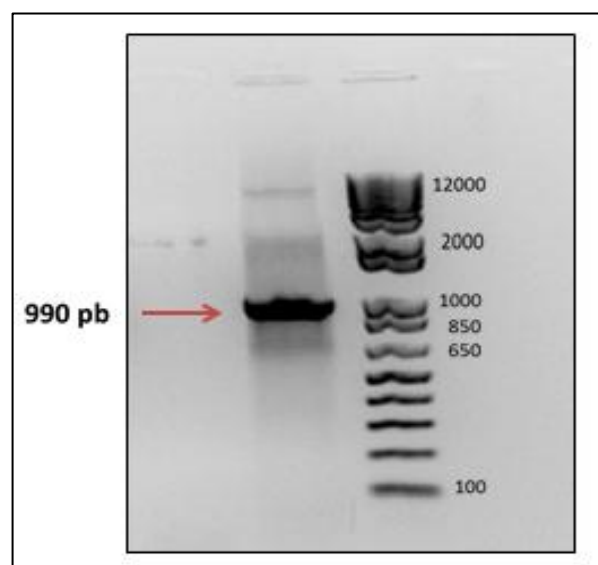


FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação por PCR do gene *TIXR1* (990 pb), que provavelmente codifica uma enzima Xilose-redutase, isolado de *T. licus licus*.

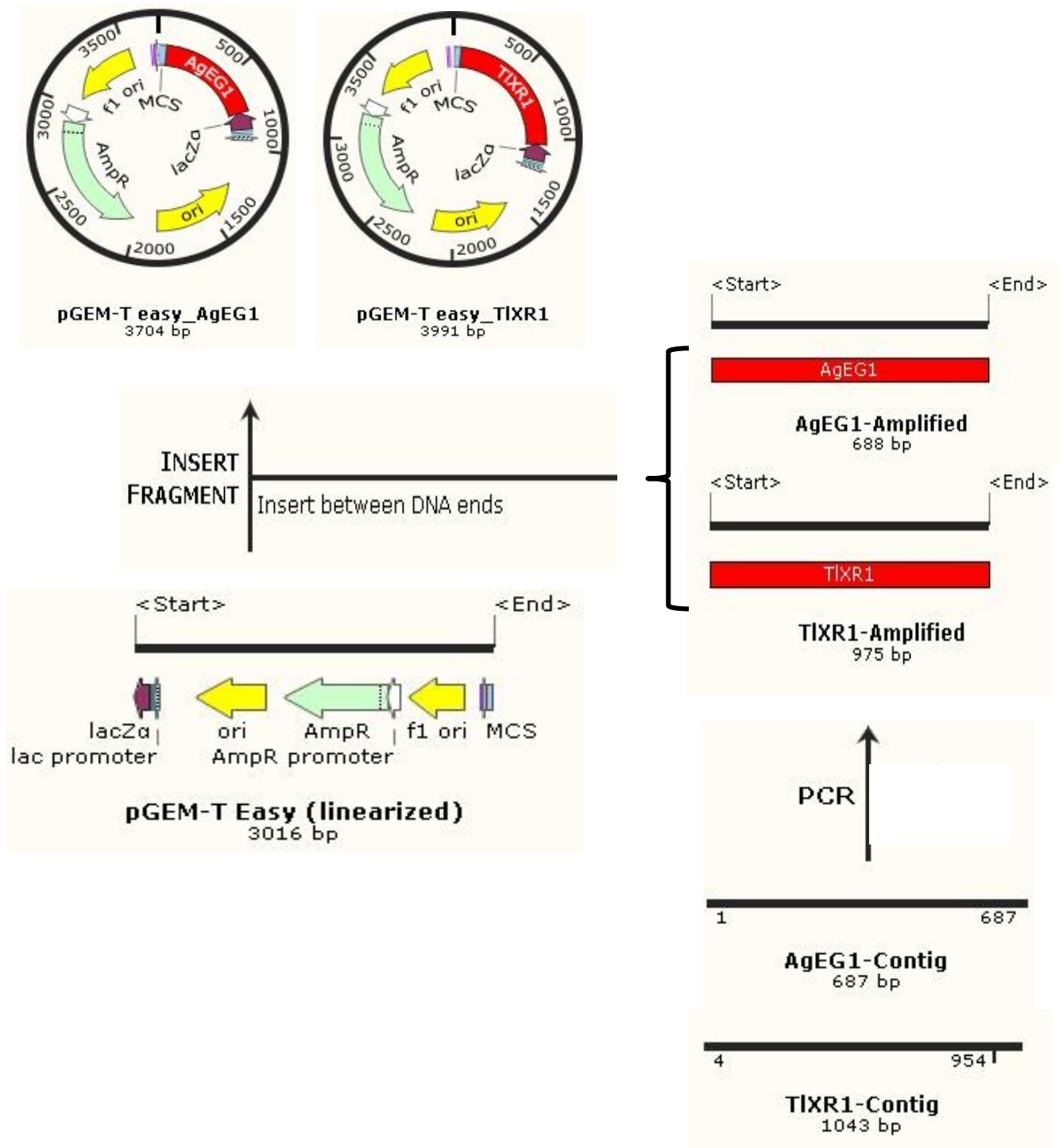


FIGURA 15. Histórico da clonagem dos genes *AgEG1* e *TIXR1*. Seguindo a direção das setas, inicialmente se apresentam os *contigs* dos genes, depois da PCR se obtêm as bandas amplificadas e concluindo com a inserção dos genes no vetor pGEM-T Easy linearizado.

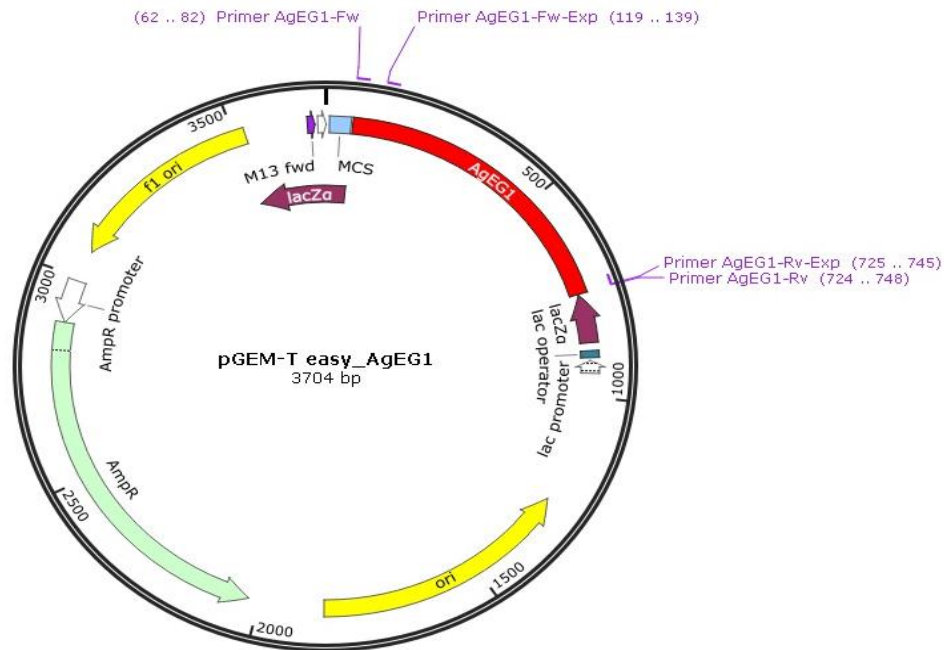


FIGURA 16. Representação da construção pGEM-T Easy\_AgEG1; o mesmo contém os primers “AgEG1-Fw” e “AgEG1-Rv”, como também os primers desenhados para a clonagem no vetor de expressão: “AgEG1-Fw-Exp” e “AgEG1-Rv-Exp” (Exp: expressão).

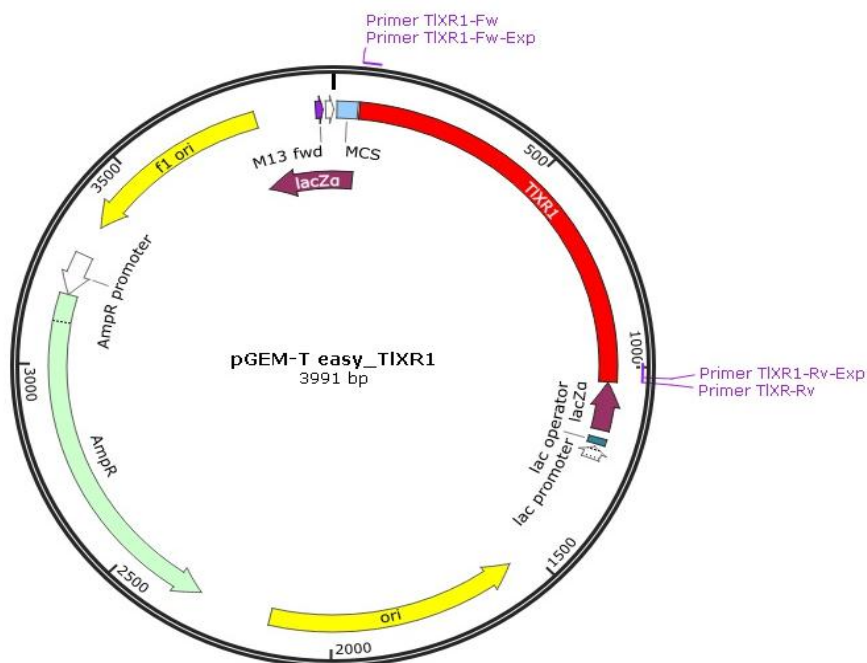


FIGURA 17. Representação da construção pGEM-T Easy\_TiXR1; o mesmo contém os primers “TiXR1-Fw” e “TiXR1-Rv”, como também os primers desenhados para a clonagem no vetor de expressão: “TiXR1-Fw-Exp” e “TiXR1-Rv-Exp” (Exp: expressão).



## 5.2 SEQUÊNCIA PROTEICA, ALINHAMENTO FILOGENÉTICO, SÍTIOS DE GLICOSILAÇÃO E PEPTÍDEO SINAL.

O resultado do alinhamento de sequências de DNA demonstra que o gene *AgEG1* possui alta semelhança (>60%) com outras sequências de genes de diferentes coleópteros encontradas no banco de dados. Alguns desses genes já estão caracterizados como  $\beta$ -1,4-endoglucanases endógenas pertencentes à família GH45 (FIGURA 18). A árvore filogenética representa claramente a relação que existe entre a sequência do *A. grandis* e outras sequências de enzimas caracterizadas com  $\beta$ -1,4-endoglucanases. Essas relações evolutivas são mais altas entre genes de coleópteros que possuem essas enzimas endógenas, porém também existem vínculos filogenéticos com outros genes de organismos variados, provenientes de reinos diferentes (FIGURA 19). A proteína predita possui um peso molecular estimado em 21,4 kDa, sem contar com a cauda de histidina (FIGURA 20), e ponto isoelétrico (pI) predito é de 5,16. Os sítios de O-glicosilação foram preditos para 20 treoninas (Thr) e 17 serinas (Ser) (dados não apresentados). Foi predito que existe N-glicosilação com um resíduo de Asparagina (Asn) na posição 70 da sequência do *AgEG1* (FIGURA 21), e o peptídeo sinal (FIGURA 22), posteriormente deletado para a clonagem do gene no vetor de expressão.

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. Specific hits Superfamilies

Glyco\_hydro\_45

Glyco\_hydro\_45 superfamily

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein YQE_03148 [Dendroctonus ponderosae]	350	350	98%	6e-119	79%	<a href="#">ENN80432.1</a>
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein YQE_03147 [Dendroctonus ponderosae]	337	337	99%	5e-114	75%	<a href="#">ENN80431.1</a>
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein YQE_03146 [Dendroctonus ponderosae]	337	337	99%	5e-114	75%	<a href="#">ENN80430.1</a>
<input type="checkbox"/>	endo-beta-1,4-glucanase [Sitophilus oryzae]	305	305	97%	2e-101	68%	<a href="#">ADU33246.1</a>
<input type="checkbox"/>	endo-beta-1,4-glucanase [Sitophilus oryzae]	293	293	96%	2e-96	69%	<a href="#">ADU33247.1</a>
<input type="checkbox"/>	cellulase I [Apriona germari]	273	273	95%	2e-88	65%	<a href="#">AAU44973.1</a>
<input type="checkbox"/>	endo-beta-1,4-glucanase [Leptinotarsa decemlineata]	271	271	94%	4e-88	64%	<a href="#">ADU33350.1</a>
<input type="checkbox"/>	glycoside hydrolase family 45 protein [Phaedon cochleariae]	270	270	95%	2e-87	63%	<a href="#">CCJ09450.1</a>

FIGURA 18. Resultado de BlastX realizada no banco de dados GeneBank. O *AgEG1* possui perto de 70% de semelhança com outras  $\beta$ -1,4-endoglucanases endógenas de coleópteros, além de outras celulasas pertencentes a família GH45.

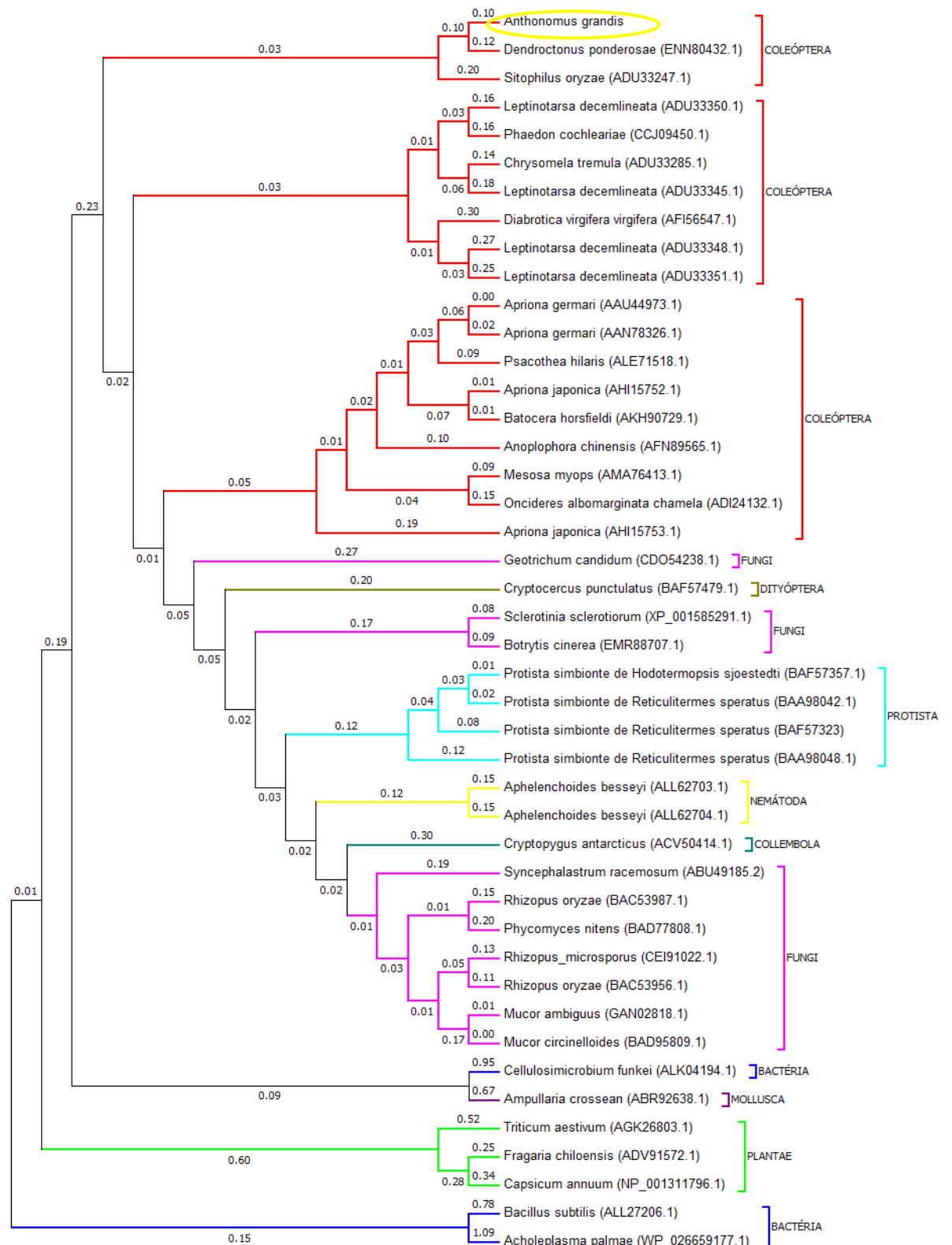


FIGURA 19. Relações filogenéticas do gene AgEG1. Cada ramo da árvore possui um número que identifica a distância filogenética existente entre cada sequência, a somatória dos ramos da árvore dá um comprimento de 12.52017468. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção Poisson e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 44 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Há um total de 117 posições no conjunto de dados final.

SQ

SEQUENCE 214 AA; D04AD61C4F4413D9 CRC64.  
MASLSGSGTTTRYWDCCCKPSCSWKENVGTLDPVDSCAADGETKLDASVTS GCDSGDGTSYV  
C>NNLQPWAVN DTLAYGFVAA SFTGGVDNSQ CCVCLKLTFK NTLAGKIMIV QNVNTGGDLG  
SNQFDIQIPG GGVGIFTRGC QTQWNAPSSG WGQQYGGVTS DAECDELPTL LQAGCHFRFG  
WYENADNPQV DFEQITCPTL LTSLTGCVND NMLE

FIGURA 20. Sequência proteica predita do gene *AgEG1* com 21,4 kDa sem a cauda de histidina. Na sequência está marcada o sítio catalítico conservado das β-1,4-endoglucanases, da família GH45 (enquadrado).

MASLSGSGTTTRYWDCCCKPSCSWKENVGTLDPVDSCAADGETKLDASVTS GCDSGDGTSYV	C>NNLQPWAVN	DTLAYGFVAA	80
SFTGGVDNSQCCVCLKLTFKNTLAGKIMIVQNVNTGGDLG	SNQFDIQIPGGGVGIFTRGCQTQWNAPSSG	WGQQYGGVTS	160
DAECDELPTL	LQAGCHFRFGWYENADNPQVDFEQITCPTL	LTSLTGCVNDNMLEHHHHH	
.....	.N.....		80
.....			160
.....			240
(Threshold=0.5)			
SeqName	Position	Potential	Jury N-Glyc agreement result
Sequence	70 NDTL	0.6847	(8/9) +

FIGURA 21. Sequência proteica do gene *AgEG1*. O único sítio de N-glicosilação no resíduo de asparagina 70 se encontra distinguido em letra vermelha.

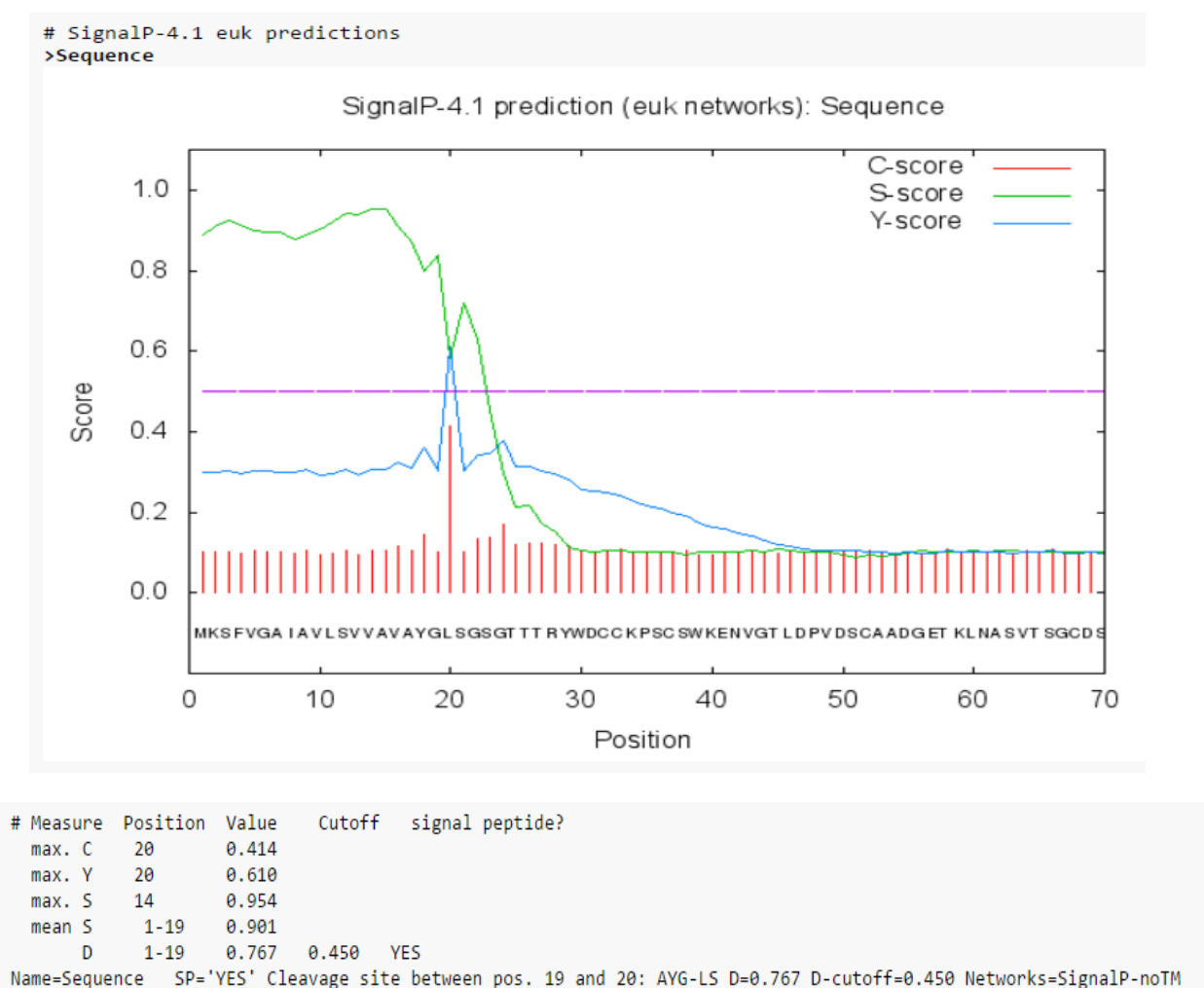


FIGURA 22. Predição do peptídeo sinal na sequência do gene *AgEG1*. A figura confirma a presença do peptídeo sinal, representado pelo sítio de clivagem na posição entre os resíduos 19 e 20 e resultados altos nos valores de score: C-score: distingue os sítios de clivagem em todo o peptídeo, sendo o máximo na posição imediatamente depois do primeiro resíduo da proteína madura (depois do resíduo de Leucina “L”, na posição 20. Valor obtido: 0,414). S-score: distingue os sítios de clivagem dentro do peptídeo sinal de outros sítios na proteína madura e proteínas sem peptídeo sinal (o máximo se encontra na posição 14 e valor 0,954). Y-score: a média geométrica do C-score e a pendente do S-score, resultando de uma melhor predição do sítio de clivagem (posição 20 e valor de 0,610). Mean S: A média do S-score do peptídeo sinal predito, desde a posição 1 até imediatamente antes do máximo do Y-score (posição 1-19 com valor de 0,9). D-score: a média do “mean S” e o máximo do Y-score. Esse score é quem discrimina a presença de peptídeo sinal nas proteínas. O valor do D-score foi alto (0,767), o resultado não discrimina a presença de peptídeo sinal.

O gene *TIXR1* teve, na sua maioria, mais de 80% de identidade com outras enzimas endógenas provenientes de insetos. Dentro de esse grupo quase todas pertencem à superfamília das Aldo-ceto redutases (AKR), onde se podem destacar, especialmente, proteínas de lepidópteros (FIGURA 23). A árvore filogenética



construída para identificar as relações filogenéticas de outras sequências com a de *T. licus licus* evidenciam que existem numerosas semelhanças entre elas. O gene que codifica uma possível xilose-redutase está relacionado principalmente com outras AKRs de lepidópteros, além de outras ordens de insetos, porém esses genes não foram caracterizados enquanto à atividade enzimática (FIGURA 24). O *TIXR1* possui semelhanças mais distantes com sequências provenientes de outros organismos de distintos reinos, as quais foram identificadas como algumas xilose-redutases, além de uma anhidro-fructose- reductase, uma 3-dehidroecdisone-3-beta-reductase, uma dihidrodiol-dehidrogenase e duas AKR2E4.

O peso molecular da proteína predita, sem cauda de histidina, foi de 32 kDa (FIGURA 25) e um pI predito de 5,0. A sequência proteica do gene *TIXR1* possui sítios de O-glicosilação, consistindo em 11 resíduos de Thr e 19 Ser; também foram encontradas dois sítios de N-glicosilação nas posições 97 e 267 de asparagina (FIGURA 26), porém, nenhum peptídeo sinal foi detectado na sequência (FIGURA 27).

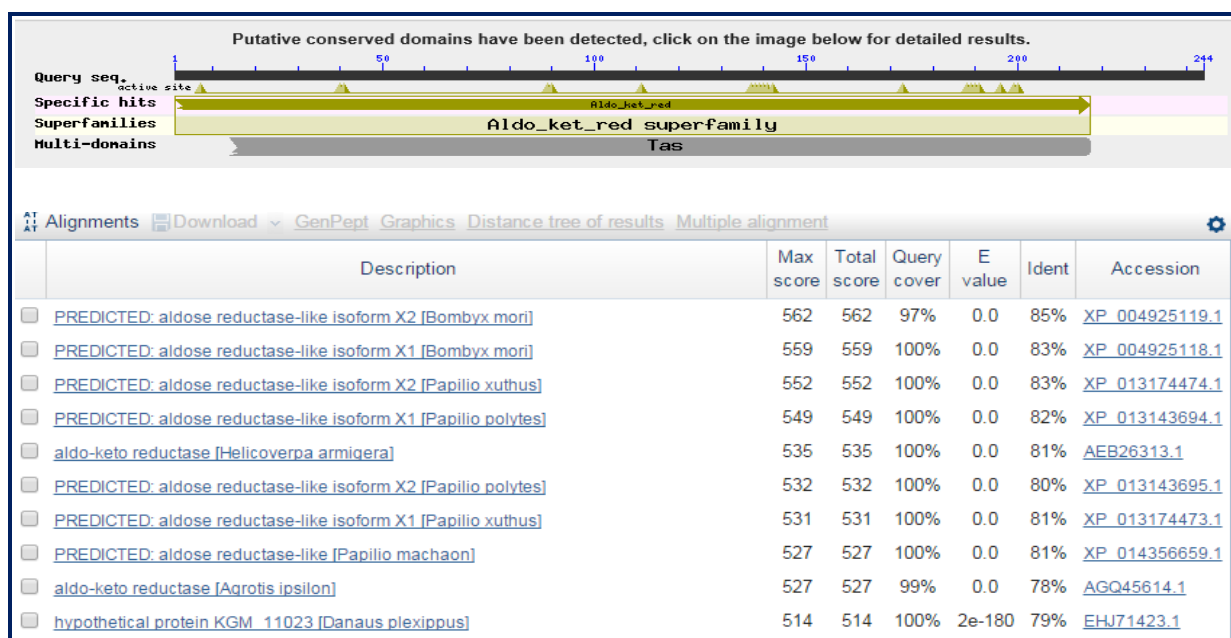


FIGURA 23. Resultado de BlastX realizado com o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). O gene *TIXR1* possui altíssima semelhança com outras enzimas endógenas da família Aldo-ceto reductases, encontradas em diferentes insetos.

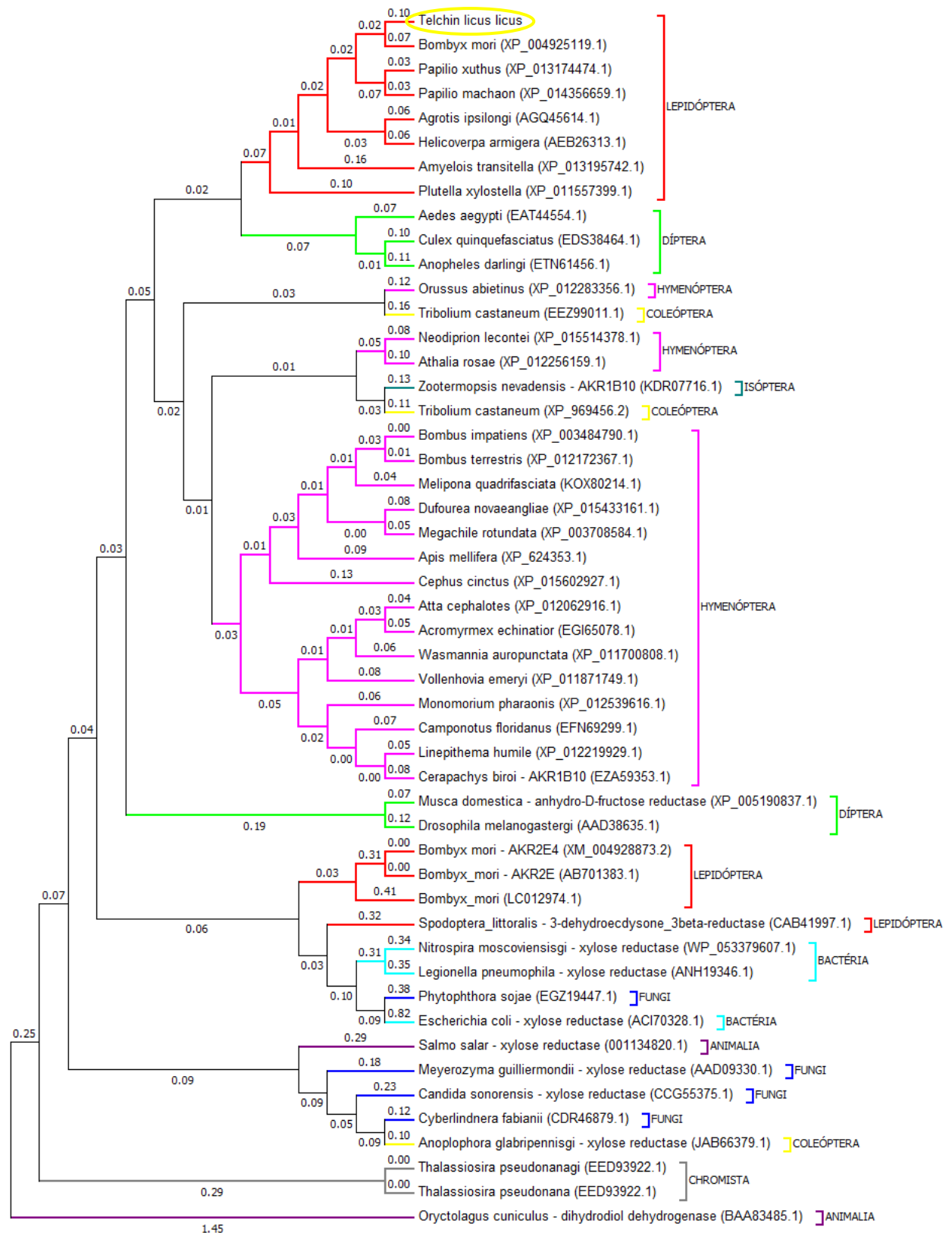


FIGURA 24. Relações evolutivas dos genes de Aldo-Ceto redutases de diferentes organismos. Cada ramo da árvore possui um número que identifica a distância filogenética existente entre cada sequência, a somatória dos ramos da árvore dá um comprimento de 10.66575625. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção Poisson e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. A análise envolveu 51 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Há um total de 139 posições no conjunto de dados final.

SQ

SEQUENCE 318 AA; 088AE0BB6A60513B CRC64.  
MASKALNXXF YNGIECPILG IGTWKSKEGE VTQAVKDAID IGYRHIDCAF VYGNEKEVGE  
AITSKISEGV VKREDLFITS KLWNTFHRPD LXRGALNKTLENLNLKYIDL YLIHWPQAYK  
EEGELFPADE SGKILFSDVD YVDTWKALEP LVDEGLVRSLGVSNFNSKQV DRLLKEVTIK  
PVVNQVECHPYLNQKRLKEF CESRGVKITA YSPLGSPDRPWAKPEDPQLMDDPKLKAIAD  
RLDKTVAQVL IRYQIDSGNI VIPKSVNKSRIASNFEVLDF KLSPEDVQLIDTFDVNGRFPMTASLGHKYHPFENDEF

FIGURA 25. Sequência proteica do gene *TIXR1* com peso molecular de 32 kDa sem cauda de histidina.

MASKALNVKFYNGIECPILGIGTWKSKEGEVTQAVKDAIDIGYRHIDCAFVYGNEKEVGEAITSKISEGVVKREDLFITS	80
KLWNTFRRPDLVRGALLENLNLKYIDLYLIHWPQAYKEEGELFPADESGKILFSDVDYVDTWKALEPLVDEGLVRSL	160
GVSNFNSKQVDRLLKEVTIKPVVNQVECHPYLNQKRLKEFCESRGVKITAYSPLGSPDRPWAKPEDPQLMDDPKLKAIAD	240
RLDKTVAQVLIRYQIDSGNIVIPKSVNKSRIASNFEVLDFKLSPEDVQLIDTFDVNGRFPMTASLGHKYHPFENDEFHH	320
HHHH	
.....	80
.....N.....	160
.....	240
.....N.....	320
....	400
(Threshold=0.5)	
SeqName	Position Potential Jury N-Glyc agreement result
Sequence	97 NKTL 0.8247 (9/9) +++
Sequence	267 NKSR 0.6109 (8/9) +

FIGURA 26. Sequência proteica do gene *TIXR1*. Os sítios de N-glicosilação nos resíduos 97 e 267 de asparagina na sequência estão distinguidos em letra vermelha.

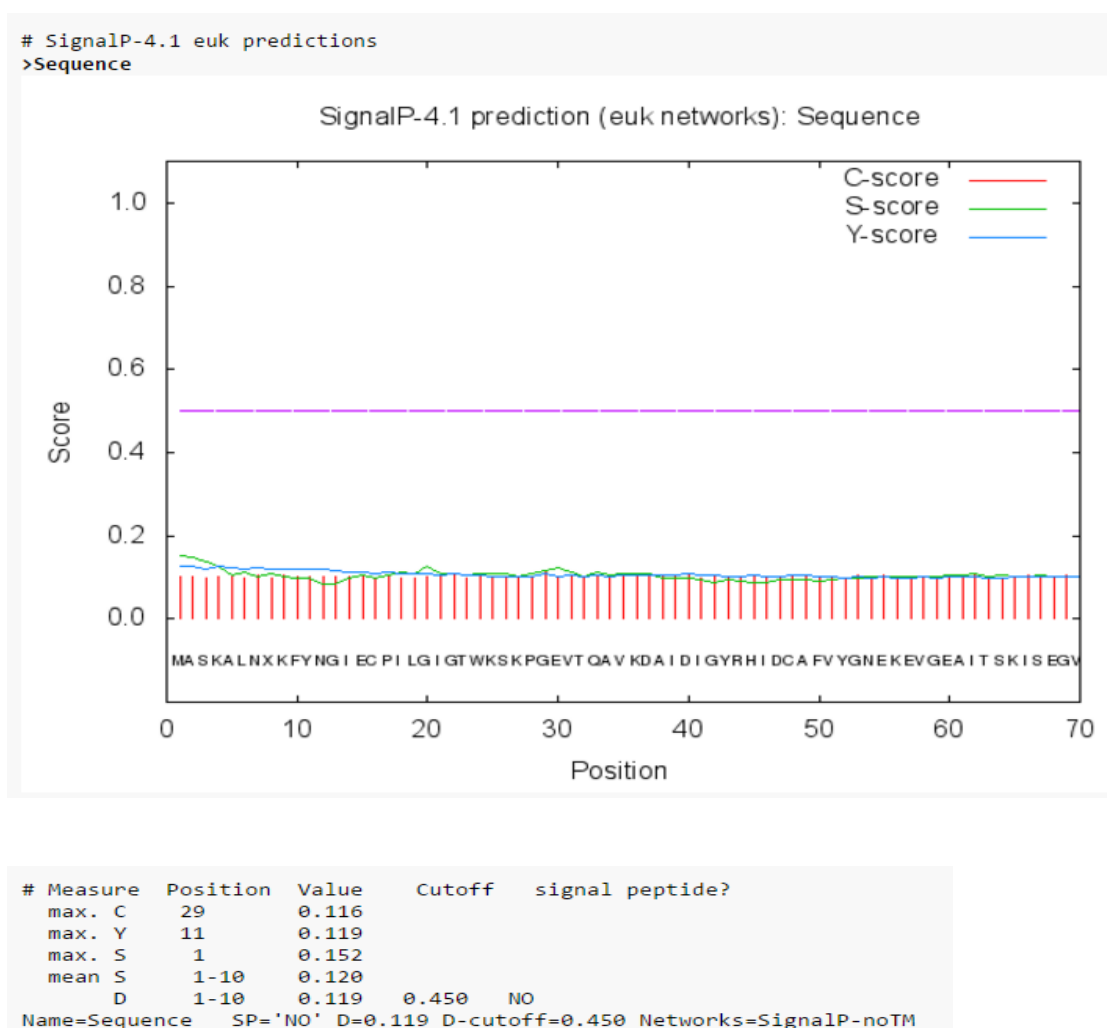


FIGURA 27. Análise para predição do peptídeo sinal na sequência do gene *TIXR1*. O valores de todos os scores são muito baixos, perto de 0,1 (valor-alvo negativo), portanto a proteína não possui peptídeo sinal.

### 5.3 CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM POR DIGESTÃO

Para clonagem dos dois genes no vetor de expressão pGAPZαB (FIGURAS 26 e 27) foi deletado o peptídeo sinal no gene *AgEG1*, os códons de início de parada em ambos genes e foram utilizados os primers com os sítios para as enzimas de restrição que permitiram a inserção do gene no vetor (*EcoRI* e *SalI* para *AgEG1*, *EcoRI* e *NotI* para *TIXR1*); no caso do gene *TIXR1*, foi adicionado a cauda de histidina no desenho do primer “reverso”. Após a clonagem, foi confirmada por sequenciamento e digestão a inserção dos genes no vetor pGAPZαB. As reações de

digestão foram comprovadas em gel de agarose 1% e os resultados foram positivos para todos os clones de *E. coli* transformados e selecionados para o teste (FIGURA 28). O gel revelou a liberação dos fragmentos de interesse do vetor pGAPZαB, utilizando as enzimas de restrição que clivaram os sítios desenhados nos primers.

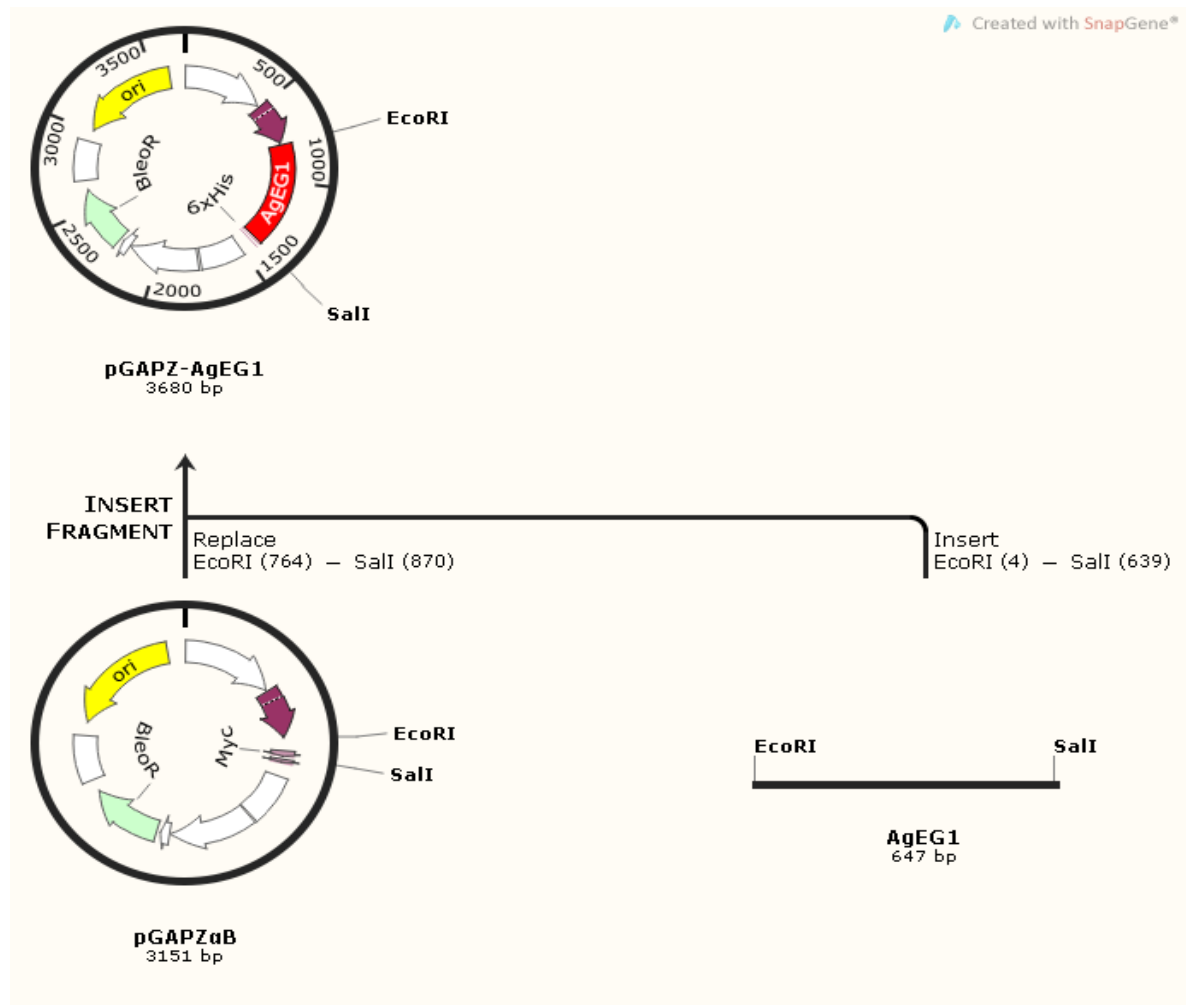


FIGURA 28. Histórico da clonagem do gene *AgEG1* no vetor de expressão. Os DNAs foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *SalI* para posteriormente ser ligados nos sítios correspondentes, dando como resultado o constructo pGAPZαB-*AgEG1*.

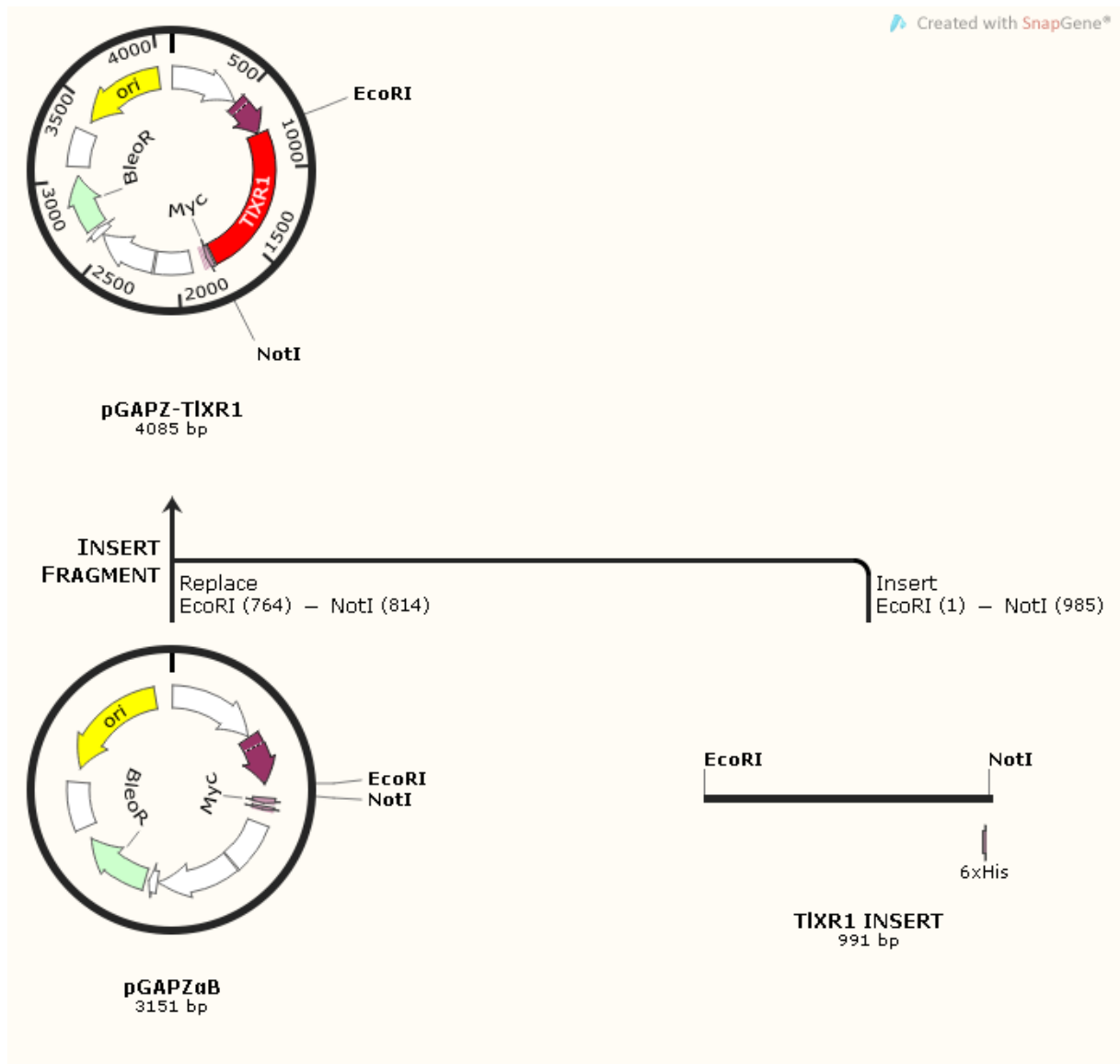


FIGURA 29. Histórico da clonagem do gene *TIXR1* no vetor de expressão. Os DNAs foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *NotI* para posteriormente ser ligados nos sítios correspondentes, dando como resultado o constructo pGAPZαB-*TIXR1*.

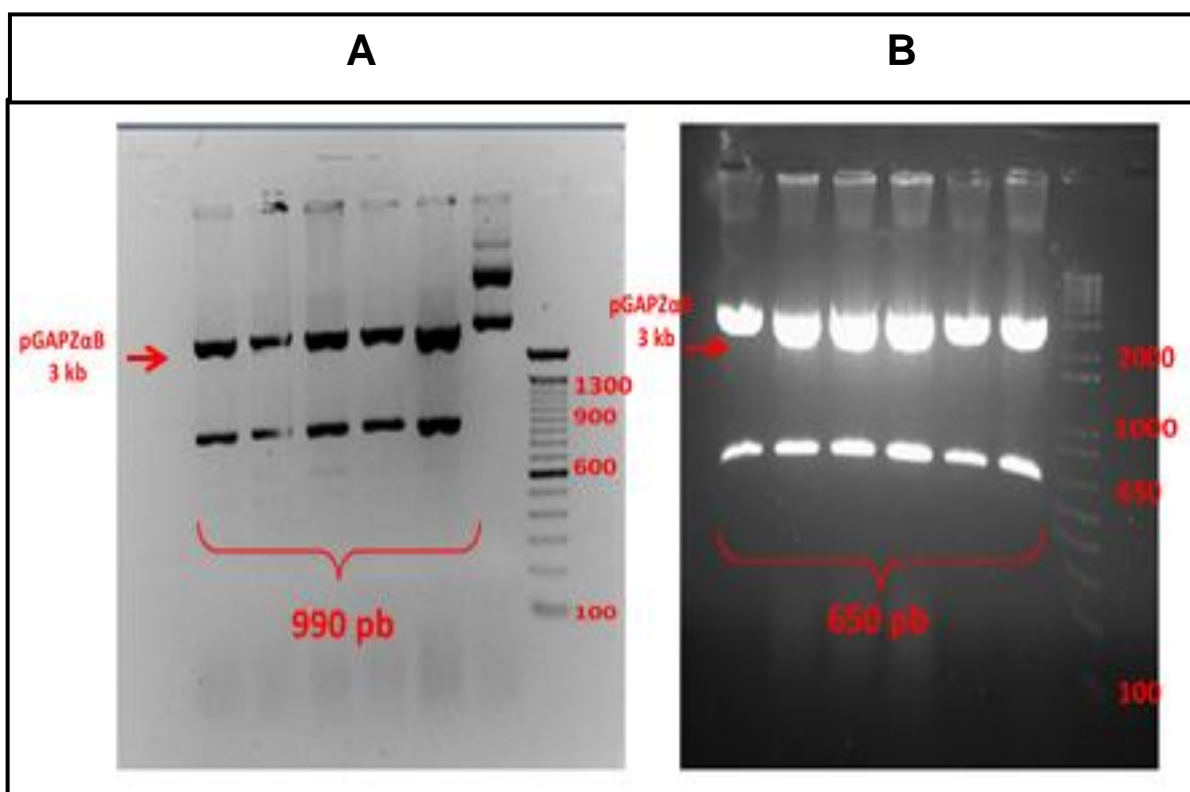


FIGURA 30. Gel de agarose 1% para confirmar a clonagem dos genes *AgEG1* e *TIXR1* no vetor pGAPZαB, através de reações de digestão. A reação foi efetuada com as enzimas de restrição para clivar e liberar os genes de interesse, ligados ao vetor pGAPZαB. Gel A: liberação de fragmentos de 990 pb correspondente ao gene *TIXR1*. Gel B: liberação de fragmentos de 650 pb correspondentes ao gene *AgEG1*.

#### 5.4 LINEARIZAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS CLONES TRANSFORMADOS

Para a transformação da levedura *Pichia pastoris*, foram linearizados os DNAs (pGAPZαB-*AgEG1* e pGAPZαB-*TIXR1*) utilizando enzimas de restrição selecionadas (FIGURA 29 e 30). Depois de sucessivas transformações com as cepas SMD1168H e X33 de *Pichia pastoris*, utilizando o protocolo do eletroporador (MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions), obtendo-se um resultado de 4,2 ms no eletroporador, a PCR de colônias realizada com clones desenvolvidos nos meios de seleção, deu indícios da integração dos genes no cromossomo da levedura. Estes resultados positivos foram obtidos unicamente com a cepa selvagem X33. Foram positivas duas colônias contendo o gene *AgEG1* e todas as seis colônias para o gene *TIXR1* (FIGURA 31).

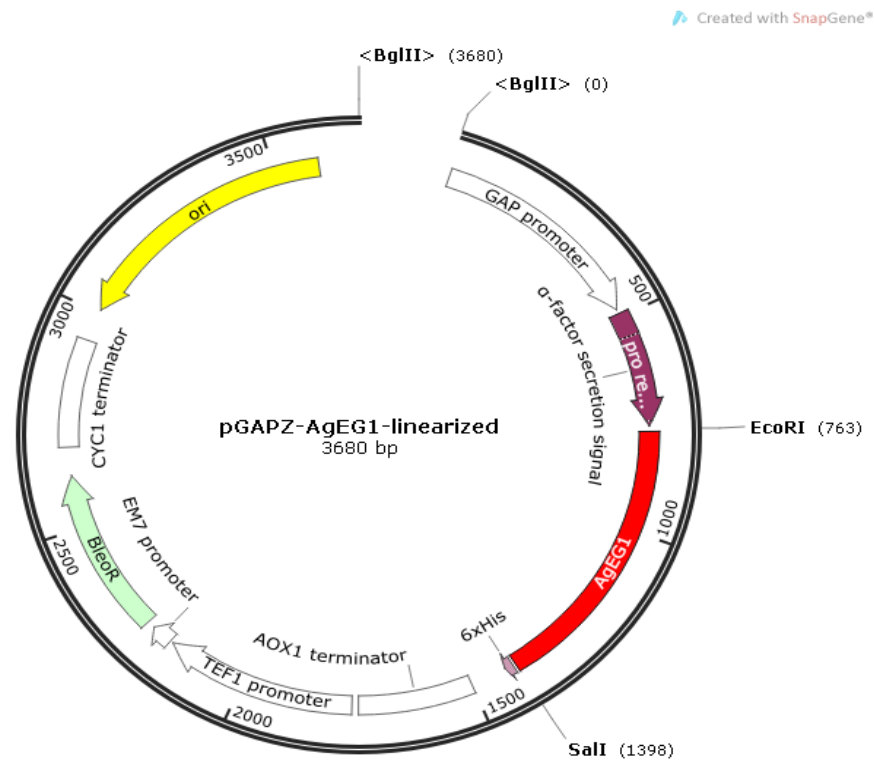


FIGURA 31. Vetor de expressão pGAPZαB-*AgEG1* linearizado com a enzima *BglII*. A construção apresenta um tamanho de 3680 pb, o gene *AgEG1* está inserido entre os sítios de *EcoRI* e *Sali* (vermelho).

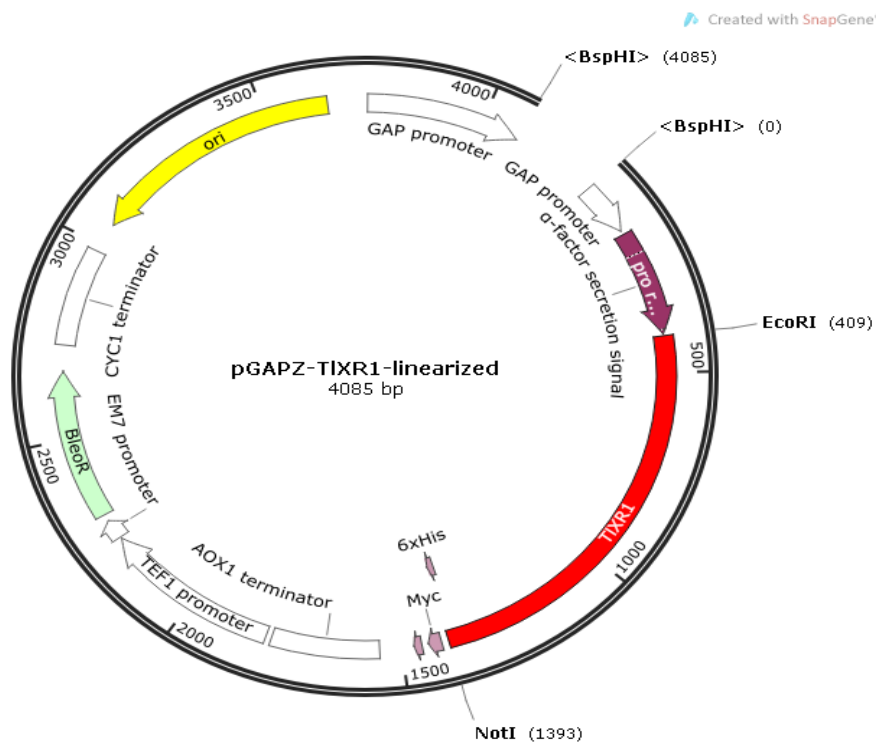


FIGURA 32. Vetor de expressão pGAPZαB-*TIXR1* linearizado com a enzima *BspHI*. A construção apresenta um tamanho de 4085 pb, o gene *TIXR1* está inserido entre os sítios de *EcoRI* e *NotI* (vermelho).



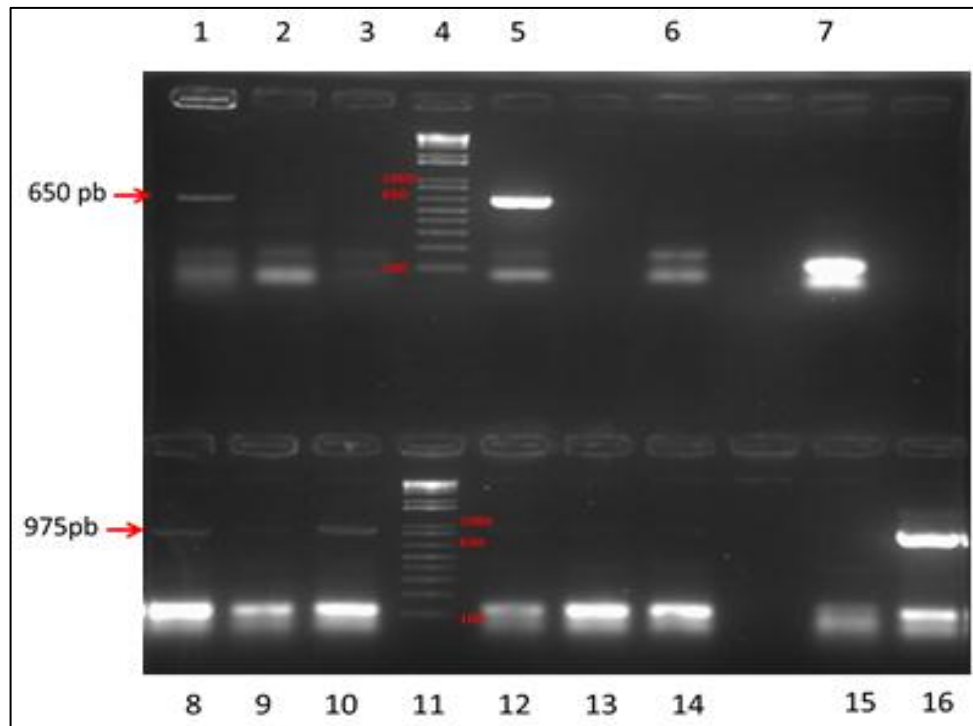


FIGURA 33. PCR de colônias dos clones integrados em *Pichia pastoris* (X33). Linhas 1, 2 e 3: três colônias transformadas com o gene *AgEG1* (EG1-1, EG1-2 e EG1-3); linha 4: marcador 1 kb; linha 5: controle positivo do gene *AgEG1*; linha 6: controle negativo (vetor vazio, sem o gene); linha 7: controle negativo 2 (branco da reação). Linha 8, 9, 10, 12, 13 e 14: diferentes colônias transformadas com o gene *TIXR1* (XR1-1, XR1-2, XR1-3, XR1-4, XR1-5, XR1-6); linha 11: marcador 1 kb; linha 15: controle negativo (branco da reação); linha 16: controle positivo do gene *TIXR1*. Pode-se ver os tamanhos de 650 pb para o gene *AgEG1* e 975 pb para o gene *TIXR1*, marcados na imagem frente as linhas 1 e 8, representando a amplificação das bandas.

## 5.5 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Após realização de SDS-PAGE, ficou evidenciado a presença de possíveis bandas correspondentes aos pesos moleculares das duas proteínas (21,4 kDa e 32 kDa), expressadas no meio extracelular; já nos resultados das proteínas intracelulares, se obtiveram bandas muito fracas com peso molecular perto de 40 kDa para ambas proteínas, além de que estes dois géis são muito parecidos um com outro. Com estes resultados bastante semelhantes, se conclui que as proteínas

de interesse não foram expressas no meio intracelular, revelando bandas de proteínas próprias da levedura.

As amostras de proteínas extracelulares (alíquotas extraídas cada 24 horas até o quinto dia) expressadas pela levedura, contendo o gene *AgEG1*, revelaram bandas com peso molecular perto de 25 kDa para os dois clones (EG1 e EG2), lembrando que, com as modificações pós-traducionais e a adição da cauda de histidina, a proteína é modificada e aumenta o peso molecular, portanto é normal obter um resultado um pouco maior do que o esperado (FIGURA 34). O gel que corresponde à proteína extracelular do gene *TIXR1*, apresenta bandas com peso molecular perto de 40 kDa em todas as amostras dos dois clones de levedura avaliadas: XR1 e XR3; porém, as amostras de XR3 possuem bandas um pouco mais baixas que as de XR1; estas bandas de menor peso ficam mais perto do peso molecular da proteína (32 kDa) (FIGURA 35).

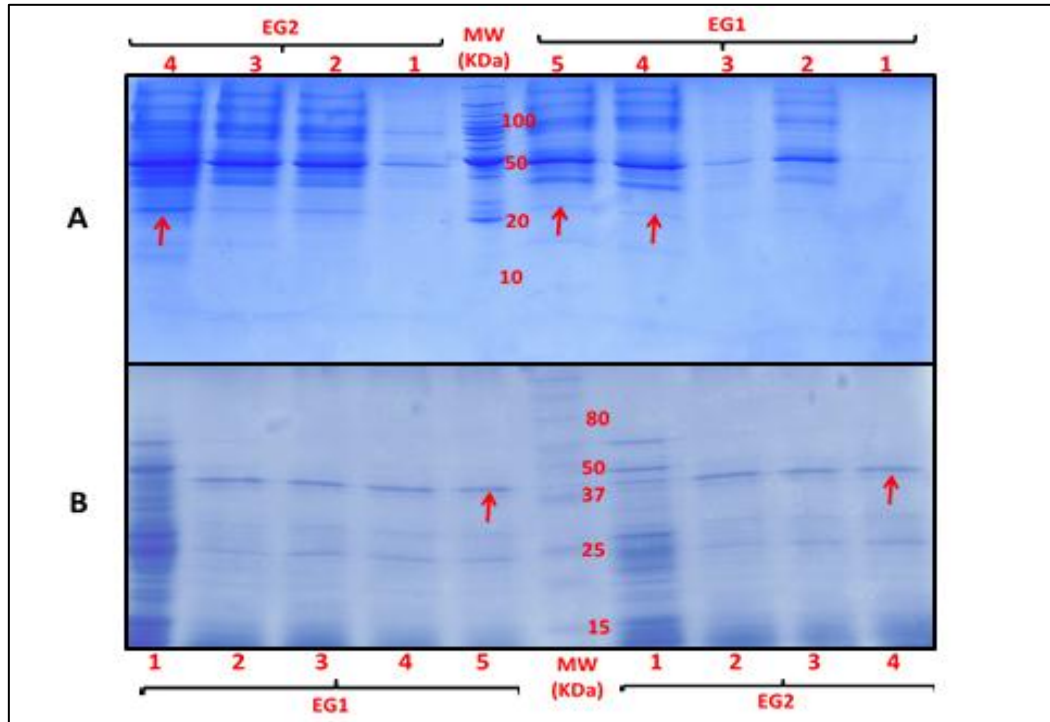


FIGURA 34. SDS-PAGE 12% com os resultados da migração das amostras de proteína intra e extra celulares, expressadas em *P. pastoris*, contendo o gene *AgEG1*. O Gel A representa as proteínas extracelulares expressadas pelas cepas EG1 e EG2, iniciando com os dias 1, 2, 3, 4 e 5 das alíquotas extraída cada 24 h da EG1, seguidas do MW (marcador Bench Mark Protein Ladder) e continuando com os dias 1, 2, 3 e 4 das amostras da EG2. As bandas candidatas estão marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão, que são mais evidentes, que apresentam um peso de ~25kDa. O Gel B apresenta a expressão das proteínas intracelulares, cuja sequencia começa com as alíquotas 1, 2, 3, 4 e 5, correspondentes aos dias de expressão para EG1, seguidas do MW (marcador Prestained Protein Ladder) e finalizando com as alíquotas 1, 2, 3 e 4 da EG2. Neste caso também aparecem bandas (marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão) com peso molecular perto de 40 kDa.

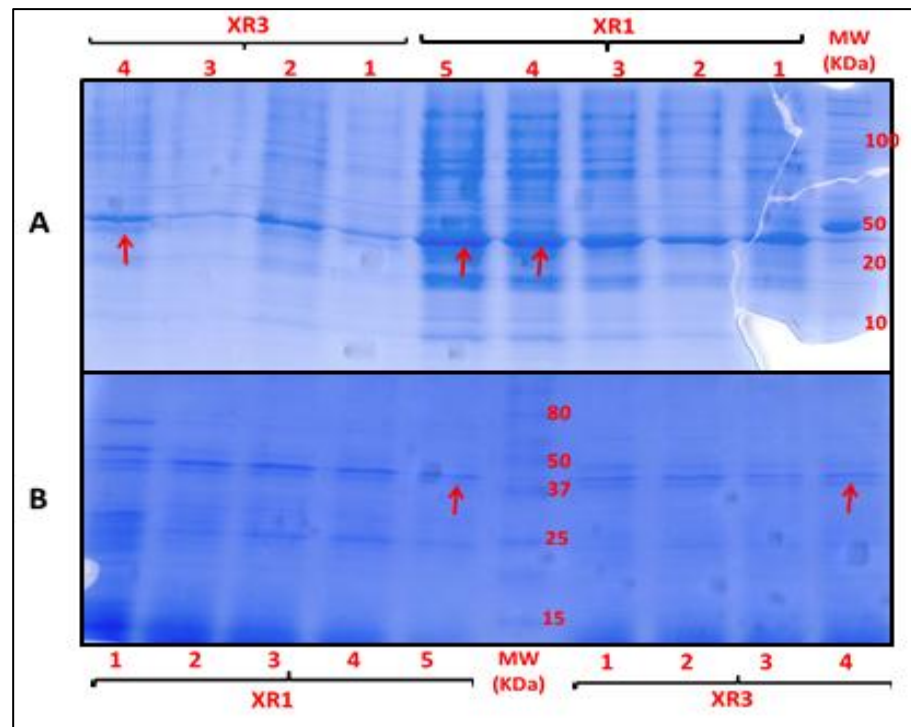


FIGURA 35. Gel de policrilamida SDS-PAGE 12% com os resultados da migração das amostras de proteína intra e extracelulares, expressadas pela *P. pastoris*, contendo o gene *TIXR1*. O Gel A representa as proteínas extracelulares expressadas pelas cepas XR1 e XR3, começando pelo MW (marcador Bench Mark Protein Ladder), desde à direita, continuando com os dias 1, 2, 3, 4 e 5 das alíquotas extraídas cada 24 h da XR1, e seguidas pelos dias 1, 2, 3 e 4 das alíquotas da XR3. Podem-se observar umas bandas candidatas, marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão, que são mais evidentes, apresentando um peso molecular de ~40 kDa. O Gel B apresenta a expressão das proteínas intracelulares, cuja sequência começa com as alíquotas 1, 2, 3, 4 e 5, correspondentes aos dias de expressão para XR1, seguidas do MW (marcador Prestained Protein Ladder) e finalizando com as alíquotas 1, 2, 3 e 4 da XR3. Neste caso também aparecem bandas (marcadas com setas vermelhas nas amostras dos últimos dias de expressão) com peso molecular perto de 40 kDa.

A proteína predita de 32 kDa, correspondente ao gene *TIXR1*, foi identificada por Western blotting, confirmando a expressão da proteína na levedura *P. pastoris*. As proteínas de alíquotas do quarto e quinto dia de expressão (FIGURA 36), emitiram sinal visível após aproximadamente 1 minuto de reação com a fosfatase alcalina, revelando um peso molecular perto de ~35 kDa.

Diferentemente, não se obtiveram os mesmos resultados para o gene *AgEG1*. O teste revelou a proteína controle positivo de 80 kDa, mas a proteína de interesse não foi identificada (dados não mostrados).

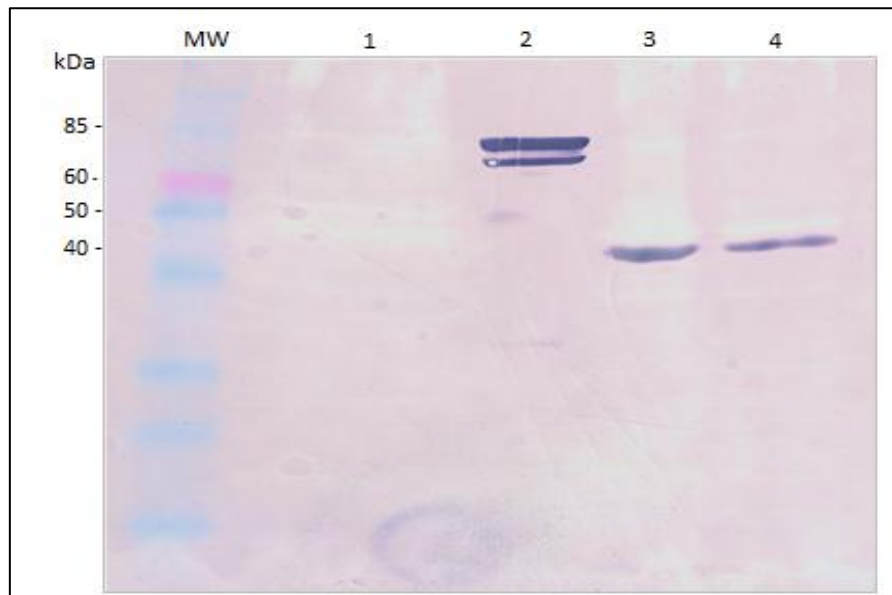


FIGURA 36. Western Blotting das proteínas oriundas da expressão dos clones contendo o gene *TIXR1* em *Pichia pastoris*. Na primeira linha se encontra o MW (marcador Prestained Protein Ladder), seguido de: 1) Expressão controle negativo (*P. pastoris* transformada com pGAPZ $\alpha$ -B vazio); 2) Controle positivo (75 kDa); 3) Sobrenadante da cultura aos 5 dias de expressão; 4) Sobrenadante da cultura aos 4 dias de expressão. A provável Xilose Redutase recombinante deve apresentar peso de ~35 kDa.

## 6 DISCUSSÃO

*Anthonomus grandis* e *Telchin licus licus* são pragas agrícolas que causam danos consideravelmente importantes em culturas como o algodão e a cana-de-açúcar, respectivamente. A obtenção do transcrito destes insetos por parte da equipe do Laboratório de Interação Molecular Pranta – Praga (LIMPP) da EMBRAPA Recursos genéticos e Biotecnologia, para o estudo e caracterização de genes alvo é um avanço promissor nas áreas de biologia molecular e biotecnologia; esses genes estão sendo utilizados para vários projetos focados principalmente na obtenção de biocombustíveis e o uso da tecnologia RNAi.

Os contigs selecionados para o desenvolvimento deste trabalho são genes candidatos a enzimas que formam parte da degradação da parede celular vegetal:  $\beta$ -1,4, endoglucanase e Aldo-Ceto redutase com provável atividade de xilose redutase. O gene *AgEG1*, analisado via BlastX, é semelhante a outras sequências de  $\beta$ -1,4, endoglucanases de insetos, além disso, ele contém a conservada N-glicosilação em celulasas da família GH45 que provêm de coleópteros. Esse sitio pode ser essencial para a atividade enzimática, especialmente para as  $\beta$ -1,4-endoglucanases (WEI *et al.*, 2005 e 2006). O gene também conserva o sitio catalítico próprio das GH45 “**TTTRYWDCCKPSC**” (LEE *et al.*, 2004 e 2005). A análise filogenética revelou que a sequência possui alta semelhança com sequências de outras celulasas da família GH45, encontrado em coleópteros, principalmente (FISCHER *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2005). Como o gene *AgEG1* também tem relação filogenética com outros genes provenientes de outros organismos mais distantes (outros artrópodos, protistas, fungos, bactérias, nematoides e moluscos), é mais provável que o mesmo foi transferido horizontalmente para um ancestral comum dos Curculionidae, embora não se tem ainda uma certeza sobre o mecanismo de transferência de genes das famílias GH45 e GH5, pois também existe a possibilidade de que o mesmo pôde ser através de um ancestral comum entre os coleópteros (FISCHER *et al.*, 2013).

No caso do gene *TIXR1*, este possui semelhança com outros genes da família Aldo-ceto redutases (AKR), porém, não foi identificada nenhuma Xilose-redutase; assim também no banco de dados de sequências (NCBI), ainda não foi registrada nenhuma XR endógena de insetos. Depois de ter avaliado outras sequências não

semelhantes, também não foi encontrada esta enzima, porém, foram caracterizadas Xilose-redutases provenientes de organismos simbióticos em insetos. As sequências semelhantes para esta enzima endógena foram submetidas diretamente no banco e identificadas como AKRs. Muitas delas possuem atividade desconhecida, outras poucas que foram sequenciadas da glândula de feromônio sexual de um lepidóptero (*Agrotis ipsilon*), e foram caracterizadas como enzimas que possivelmente interveem na biossíntese e transporte de feromônios sexuais (GU *et al.*, 2013). A análise filogenética apresenta uma relação mais distante, entre a sequência do *TIXR1* e outras sequências de xilose-redutases de diferentes organismos, incluindo um coleóptero; porém o resultado ainda é confuso, já que o mesmo gene possui alta semelhança com genes de AKRs (não caracterizadas) de distintos diferentes lepidópteros, com AKR1 (hidroxiesteroides dehydrogenases) e AKR2 (manose redutases/xilose-redutases) (DI LUCCIO *et al.*, 2006). Esses resultados podem ser mais bem explicados com dados reportados pela Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania (2016): existem dados sobre Isoformas ou variantes alélicas dentro da superfamília das AKRs, proteínas que tem > 97% de identidade nas sequências são alelos do mesmo gene, mas pode ser dar o caso de que elas possuam atividade enzimática diferente, são traduzidas a partir mRNAs e provêm de genes com diferentes estruturas.

Ensaio recente realizadas por Vasconcelos e colaboradores (2014), mostraram que o suco digestivo do *T. licus* possui maior capacidade de degradar xilana em comparação a outros polissacarídeos. Os resultados determinaram uma atividade enzimática mais alta quando a xilana é o substrato. Como *T. licus* tem uma preferência pelas hemiceluloses, este polissacarídeo é fundamental para a sua alimentação e sobrevivência. Estes genes envolvidos na digestão de hemiceluloses codificam xilanases e xilose-redutases, são de vital importância para este inseto e os convertem em foco para pesquisas posteriores visando a produção de biocombustíveis ou trabalhos com silenciamento gênico via RNAi, para controle do inseto.

Alguns trabalhos sobre a clonagem e expressão de celulasas em *Pichia pastoris* foram publicados (PHAM *et al.*, 2011; GODBOLE *et al.*, 1999; VÁRNAI *et al.*, 2014), mas geralmente, estas enzimas provêm de microrganismos ; celulasas

endógenas de insetos, são expressas principalmente em células de insetos (LEE *et al.*, 2004, 2005; WEI *et al.*, 2006; WLLIS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2008). Por outro lado, existe evidências de Xilose-redutases expressas em bactérias (FERNANDES *et al.*, 2009; WOODYER *et al.*, 2005). Aliás, o sistema de expressão na levedura *Pichia pastoris* permite uma eficiente glicosilação da proteína, possui alta e rápida taxa de crescimento das células no fermentador, geralmente resultando de altos níveis de expressão; além de outras vantagens que podem ser mencionadas: facilidade no preparo das células competentes e processo de transformação e expressão; é um sistema rápido, fácil e mais econômico, em comparação com outros sistemas que também permitem modificações pós-traducionais, como são as células de insetos ou mamíferos (MACAULEY-PATRICK, 2005).

A expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* também possui vantagem quando é comparada com *Saccharomyces cerevisiae*, ambas as leveduras têm alta capacidade de N-glicosilação de proteínas do tipo manose, a diferença de que a *S. cerevisiae* adiciona entre 50 a 150 resíduos de manose à cadeia, causando uma hiperglicosilação, sendo que a *P. pastoris* adiciona entre 8 a 14 resíduos apenas. Além disso, *P. pastoris* não contém  $\alpha$ 1,3-manose terminais como a *S. cerevisiae*, que não é desejável para expressão de proteínas de humanos, já que se convertem em fortes determinantes antigênicos, torna-as particularmente inadequados para utilização terapêutica. (GRINNA e TSCHOPP, 1989; TSCHOPP *et al.*, 1987).

O vetor de expressão pGAPZ $\alpha$ B, possibilita uma expressão constitutiva mediante o promotor GAP, que apresenta uma grande vantagem frente ao promotor AOX1 (muito utilizado, já que permite um maior controle da expressão das proteínas heterólogas, que podem ser tóxicos para o hospedeiro), pois a diferença do outro, o promotor GAP prescinde da adição de metanol como fonte de carbono, o qual é muito tóxico e economicamente inviável para ser utilizado na indústria (VÁRNAI *et al.*, 2014). Além de isso, o promotor GAP requer de menos tempo para produzir uma quantidade razoável (g/l) de peso seco de células, em comparação com o promotor AOX1 que precisa de mais do dobro do tempo (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

A transformação da cepa X33 de *P. pastoris* com ambos genes, foi bem sucedida; provavelmente se deva ao potencial da cepa e ao protocolo utilizado, o qual consistiu em eletroporação e tratamento prévio com DTT (1,4-Dithiothreitol).



Trabalhos reportados evidenciam maior eficiência na transformação de *Pichia pastoris* utilizando DTT como pre-tratamento das células antes da electroporação (WU e LETCHWORTH, 2004; THOMPSON *et al.*, 1998; SUGA e HATAKEYAMA, 2001; GANEVA *et al.*, 1995). Geralmente, células de *Pichia* são transformadas através da eletroporação ou pelo método de esferoplastos, ambos métodos podem gerar resultados similares (103–104 transformantes/ $\mu$ g de DNA), o problema está no uso de um método sem algum tipo de pré-tratamento, pois a eficiência na transformação pode ser muito baixa, devido à utilização de só um sítio para a integração, que faz dificultosa a inserção do gene, e dificuldades técnicas; porém a utilização de métodos químicos com acetato de lítio (LiAc) para a transformação de *Pichia*, é ainda pior em resultados de eficiência, comparando com os anteriores (Invitrogen, 1999).

Apesar da SMD1168H ser uma cepa com atividade protease negativa, ela não apresentou resultados positivos na expressão das proteínas. Na preparação de células competentes para transformar ambas cepas utilizadas, já se observava que a cepa X33 possuía um crescimento celular muito mais rápido e atingia uma densidade (células/ml) ideal, em comparação com a SMD1168H. Geralmente, as cepas mutadas não possuem potencial como as cepas selvagens, a exceção das que contém mutações AOX, que em alguns casos podem resultar melhores do que as selvagens. Estas cepas dispensam de grande quantidade de metanol utilizado rotineiramente nos fermentadores de grande escala (TSCHOPP *et al.*, 1987; CHIRUVOLU *et al.*, 1997). Cereghino e Cregg (2000) mencionam que as cepas com protease deficiente não são muito resistentes quanto do tipo selvagem. As proteases deficientes têm menor viabilidade, apresentam taxas de crescimento inferior e são mais difíceis de transformar.

O antibiótico cefotaxima (100  $\mu$ g/ml) adicionado aos meios YPD preveniu a contaminação da levedura *P. pastoris*, permitindo o bom crescimento e desenvolvimento das células no preparo das competentes para a transformação, nas placas de YPD/ágar e nos ensaios de microexpressão durante cinco dias, sem resultar em toxicidade para a levedura nem afetar a expressão das proteínas.

O Western Blot revelou a expressão de um gene (*TIXR1*), que demonstrou um peso maior do que o esperado, provavelmente, devido às modificações pós-traducionais (glicosilação) e a adição da cauda de histidina; assim como foi

reportado em outros estudos, esse fenômeno parece ser comum em glicoproteínas (LEE *et al.*, 2004, 2005; HAN *et al.*, 2005).

Ao contrário do gene *TIXR1*, o *AgEG1*, não apresentou evidência da expressão, possivelmente porque foi expressa em baixa quantidade, necessitando de otimização das condições de expressão desta proteína. Sabe-se que existem casos em que *P. pastoris* não secreta a proteína recombinante por diversas causas (peptídeo sinal do vetor não está funcionando corretamente, hiperglicosilação), portanto ela fica retida nas células; mas, nesse trabalho foi analisada a fração de proteína intracelular, onde também não foi detectada a proteína de interesse. A temperatura do processo joga um papel muito importante no rendimento produtivo de proteínas recombinantes; uma alta temperatura pode afetar negativamente a estabilidade da proteína recombinante (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Trabalhos reportados por Li e colaboradores (2001), relatam que foram obtidos melhores resultados baixando a temperatura do processo de produção das proteínas (de 30°C para 23°C), conseguindo um incremento no rendimento de proteínas recombinantes; sendo também efetiva uma modificação da temperatura de 30°C para 20°C (HONG *et al.*, 2002). Também existe uma hipótese de que a proteína *AgEG1* pode ter sido degradada por proteases existentes na cepa X33, ao contrário da proteína *TIXR1*, que não foi afetada por ser um gene totalmente distinto do outro, portanto não possui uma sequência proteica reconhecida por proteases nativas (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Como a X33 é uma cepa selvagem sem mutações, a proteína expressa pode ser degradada por proteases extracelulares, proteases ligadas às células e/ou proteases intracelulares liberadas das células lisadas (KANG *et al.*, 2000). Estudos mais aprofundados serão realizados, para otimizar a expressão dos genes de interesse em *P. pastoris*.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Ambos os genes (*AgEG1* e *TIXR1*) foram clonados corretamente no vetor pGEM-T Easy e no vetor de expressão pGAPZ $\alpha$ B.
- Os vetores foram transformados positivamente em *Pichia pastoris* (cepa X33).
- O gene *TIXR1* que codifica uma provável Xilose-redutase, foi expresso em *Pichia pastoris*, na cepa X33 de alto potencial e rápido crescimento, em condições favoráveis nas quais se deu a expressão da proteína.
- Deve-se procurar diferentes alternativas e avaliar outras condições para a expressão do gene *AgEG1* em *Pichia pastoris*. É necessário transformar novamente a cepa X33 para a obtenção de outras colônias e continuar com os ensaios.
- É importante dar seguimento aos experimentos com estes dois genes para obter ambas as proteínas purificadas, expressão em grande escala, caracterização e avaliação da atividade enzimática; como também avaliar o potencial e eficiência da enzima na degradação de biomassa vegetal, e, futuramente, na produção de etanol na mistura com outras enzimas que seguem a via de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis.

## REFERÊNCIAS

1. ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
2. AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v. 55, p. 309-318, 2002.
3. BARR BK, HSIEH Y-L, GANEM B, WILSON DB. Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35:586–592, 1996.
4. BARROS, R. O.; PAREDES, R. S.; ENDO, T.; BON, E. P. S.; LEE, S. H. Association of Wet Disk Milling and Ozonolysis as Pretreatment for Enzymatic Saccharification of Sugarcane Bagasse and Straw, *Bioresource Technology* v. 136, p. 288-294, 2013.
5. BERG, I. A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways. *Applied Environmental Microbiology*, v. 77, p. 1925-1936, 2011.
6. BON, E. P. S.; FERRARA M. A. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. In: *The role of agricultural biotechnologies for production of bioenergy in developing countries*. Roma, FAO publications, 2007. 11p. Disponível em: <http://www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm>.
7. BRASILEIRO, Ana Cristina Miranda; CRANEIRO, Vera Talavares de Campos. *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-spi/embrapa-cenargen, 1989.
8. BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Editora Blucher, p. 365-380, 2010.
9. CALDERÓN-CORTÉS, N.; QUESADA, M.; WATANABE, H.; CANO-CAMACHO, H.; OYAMA, K. Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 45–71, 2012.
10. CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 37, p. 233–238, 2009.

11. CARRASCO, C.; BANDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAGERDAL, B. H.; ZACCHI, G.; LIDEN, G. SO<sub>2</sub>-Catalyzed Steam Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse, *Enzyme and Microbial Technology*, 2010.
12. CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; FERREIRA, M. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena - SP, Brasil. *Quim.Nova, Revisão*, Vol. 32, No. 8, p. 2191-2195, 2009.
13. CASTRO, M. A. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar. 212 f. 2006. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
14. CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews* 24, p. 45-66, 2000.
15. Chevron Corporation. Energy Supply and Demand, 2014. Disponível em <http://www.chevron.com/globalissues/energysupplydemand/>.
16. CHIRUVOLU, V.; CREGG, J. M.; MEAGHER, M. M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichiapastoris* in fed-batch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 277-283. 1997.
17. DA SILVA, A. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos : efeito na desestruturação da parede. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Setor de Ciências Matemáticas e da Natureza – CCMN, Instituto de Química – IQ, Departamento de Bioquímica Ayla Sant, Rio de Janeiro, 2013.
18. DI LUCCIO, E.; ELLING, R.; WILSON, D. K. Identification of a novel NADH-specific aldo-keto reductase using sequence and structural homologies. *The Biochemical Journal*, 400(1), 105–14, 2006. <http://doi.org/10.1042/BJ20060660>
19. DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, [S. l.], v. 1, p. 2–17, 2009.
20. FARINAS, C.S. A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. 1 ed. Embrapa Instrumentação, São Paulo. 2011.
21. FENG, R.; ZHAO, D.; GUO, YONGJUN. Revisiting characteristics of ionic liquids: A review for further application development. *Journal of Environmental Protection*, v. 1, p. 95-104, 2010.
22. FENGEL, D., WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York : Waster & Grugter, 1984. 613p.

23. FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
24. FERNANDES, S.; TUOHY, M. G.; MURRAY, P. G. Xylose reductase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*: cloning and heterologous expression of the native gene (Texr) and a double mutant (Texr K271R + N273D) with altered coenzyme specificity. *Journal of Biosciences*, 34(6), 881–890, 2009. <http://doi.org/10.1007/s12038-009-0102-7>
25. FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J.; FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilization of CO<sub>2</sub> as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and straw for ethanol production”, *Biotechnology Biofuels* v.3, pp. 1-8, 2010.
26. FISCHER, R.; OSTAFE, R.; TWYMAN, R. M. Cellulases from insects. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 136, 51–64. doi:10.1007/10\_2013\_206, 2013.
27. GAMBINA, J.C. Crise energética e preço do petróleo: luta pela hegemonia no capitalismo em crise. *ODiario.info*, 2014. Disponível em <http://www.odiarario.info/?p=3478>
28. GANDOLFI, CB; HARMANTAS, A; SOLER-LEONARTE, O. Abundant Clean Energy Fuels Brazil's Growth. *Power*. 156, p.46, 2012.
29. GANEVA, V.; GALUTZOV, B.; TEISSIE, J. Electric field mediated loading of macromolecules in intact yeast cells is critically controlled at the wall level. *Biochim. Biophys. Acta* 1240:229-236, 1995.
30. GE Healthcare. Affinity Chromatography: Principles and Methods. *GE HealthCare Handbooks*, 159, 2007. Disponível em: <http://doi.org/18-1132-29>.
31. GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Review Genetic Transformation of Yeast, *BioTechniques* 30:816-831, 2001.
32. GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology*, Minneapolis, v. 153, p. 444-455, 2010.
33. GIRARD, C.; JOUANIN, L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:1129–42, 1999.
34. GÍRIO, F.M., FONSECA, F., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGELLUKASIK, R. Hemiceluloses for fuel: A review, *Bioresource Technology*, v.101, 4775-4800, 2010.

35. GODBOLE, S.; DECKER, S. R.; NIEVES, R. A.; ADNEY, W. S.; VINZANT, T. B.; BAKER, J. O.; ... HIMMEL, M. E. Cloning and Expression of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I in *Pichia pastoris*, 828–833, 1999.
36. GONG, C.S.; CHEN, M. C.; FLICKINGER, L.C.; CHIANG, G. T. TSAO. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:430–436, 1981.
37. GRINNA, L.S.; TSCHOPP, J.F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* 5: 107–115, 1989.
38. GU, S.; WU, K.; GUO, Y.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M.; ZHOU, J. Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics*, BioMed Central, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/636>.
39. HACKER, B.; HABENICHT, A.; KIESS, M.; MATTES, R. Xylose utilisation: cloning and characterisation of the xylose reductase from *Candida tenuis*. *Biol. Chem.* 380:1395–1403, 1999.
40. HAHN-HAGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GARDONYI, M.; VAN ZYL, W. H.; OTERO, R. R. C.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 73, 53–84, 2001.
41. HAN, J.H.; LEE, K.S.; LI, J.; KIM, I.; JE, Y.H.; KIM, D.H.; SOHN, H.D.; JIN, B.R. Cloning and expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the spider, *Araneus ventricosus*. *Comp. Biochem. Physiol., B* 140, 427–435, 2005.
42. HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JONSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79(4): 438–449, 2002.
43. HUANG, C.F.; JIANG, Y.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology*, v.102, p.3322–3329, 2011.
44. International Energy Agency (IEA). “Bioenergy agreement: Task 32 – Biomass combustion and cofiring, 2001. Disponível em [http://www.ieabcc.nl/meetings/32\\_01\\_meeting\\_Zuerich.pdf](http://www.ieabcc.nl/meetings/32_01_meeting_Zuerich.pdf).
45. International Energy Agency (IEA). Outlook. Washington, 2003. Disponível em: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/archive/ieo03/index.html>.

46. Invitrogen. Multi-copy Pichia ExpressionKit, Version E. Carlsbad, CA, 1999.
47. JACKSON, S.; NICOLSON, S.W. Xylose as a néctar sugar : from biochemistry to ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v.131, 613-620, 2002.
48. JIN, Y.; PENNING, T.M.; ANNU. *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, p. 263–292, 2007.
49. KANG, H. A.; CHOI, E. S.; HONG, W. K., et al. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 575–582, 2000.
50. KASANA, RC; SALWAN, R; DHAR, H; DUTT, S; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial celulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbial* 57:503-507. DOI 10.1007/s00284-008-9276-8, 2008.
51. KIM, N.; CHOO, Y.M.; LEE, K.S.; HONG, S.J.; SEOL, K.Y.; JE, Y.H.; SOHN, H.D.; JIN, B.R. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family 9 cellulase distributed throughout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150B, 368–376, 2008.
52. KRISHNAN, C., SOUSA, L. C., JIN, M., CHANG, L., DALE, B. E., BALAN, V. Alkali-based AFEX pretreatment for conversion of sugarcane bagasse and caneleaf residues to etanol, *Biotechnology and Bioengineering* v. 107, p. 441-450, 2010.
53. KURAKAKE, M.; KISAKA, W.; KOMAKI, T. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. *App. Biochem. Biotechno.*, v. 90, p. 251-259, 2001.
54. LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G ; LICHWA, J.; ANTAL Jr.,M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and stem pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v.81,p.33 – 44, 2002.
55. LEE, J. K.; KOO, B. S.; KIM, S. Y. Cloning and characterization of the *xyl1* gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6179–6188, 2003.
56. LEE, S. J.; KIM, S. R.; YOON, H. J.; KIM, I.; LEE, K. S.; JE, Y. H.; JIN, B. R. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 139(1), 107–116, 2004.



57. LEE, S. J.; LEE, K. S.; KIM, S. R.; GUI, Z. Z.; KIM, Y. S.; YOON, H. J.; JIN, B. R. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: gene structure, expression, and enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 140(4), 551–60. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.12.003>, 2005.
58. LEHNINGER, A.L. *Principios de bioquímica*. 4 ed, Sao Paulo, 2006.
59. LEVANON, Y. *Manual de trabalhos práticos em Bioquímica*, v.1, p.2-8, 2003.
60. LI, Z.; XIONG, F.; LIN, Q., et al. Low temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Pur* 21(3): 438–445, 2001.
61. LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4900–4906, 2010.
62. LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN, Z.Y. L.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, New York, v. 66, p. 506–577, 2002.
63. MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. Chichester, England, 22(4), p. 249–70, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/yea.1208>.
64. MAYR, P.; BRUGGLER, K. D.; KULBE,.; NIDETZKY, B. D-Xylose metabolism by *Candida intermedia*: isolation and characterisation of two forms of aldose reductase with different coenzyme specificities. *J. Chromatogr. B* 737:195–202, 2000.
65. MARTIN, M.M. Cellulose digestion in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology* 75, 426–428, 1983.
66. MARTÍNEZ, E. A.; VILLARREAL, M.L.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N.; CANILLHA, L.; MUSSAMATO, S.I. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v.3, n.5, 295–301, 2002.
67. MCKENDRY, P. Energy production from biomass (Part 1): Overview of biomass. *Bioresource Technology* 83(1), p. 37–46, 2002.

68. MESA, L.; GONZÁLES, E.; CARA, C.; GONZÁLES, M.; CASTRO, E.; MUSSATTO, S. I. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse”, Chemical Engineering Journal v. 68, pp. 1157–1162, 2011.
69. MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolysates. Enzyme Microb Technol, v.36, p. 294-300, 2005.
70. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estatísticas, 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>.
71. Ministério de Minas e Energia (MME). Publicações, 2010. Disponível em: [http://www.mme.gov.br/mme/menu/todas\\_publicacoes.html](http://www.mme.gov.br/mme/menu/todas_publicacoes.html).
72. Ministério de Minas e Energia (MME). Boletim mensal dos combustíveis renováveis, 2014. Disponível em [www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html](http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html).
73. MIRANDA, A.T. Fontes de energia: Carvão, petróleo, gás, água e urânio. UOL Educação/Geografia, 2009. Disponível em <http://educacao.uol.com.br/disciplinas/geografia/fontes-de-energia-2-carvao-petroleo-gas-agua-e-uranio.htm>.
74. MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. Biochemistry Journal, v.363, p.769–776, 2002.
75. MOHAGHEGHI A.; DOWE, N., SCHELL D.; CHOU, Y-C; EDDY C.; ZHANG M. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate, Biotechnol. Lett. v.26, p. 321–325, 2004.
76. MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of Pineapple Stem Juice to Enhance Enzyme-hydrolytic Efficiency for Sugarcane Bagasse after an Optimized Pretreatment with Alkaline Peroxide, Applied Energy v. 88, pp. 403-408, 2011.
77. MORAIS, S.A.L. Contribuição ao estudo químico de Ligninas de *Eucalyptus grandis*. Belo Horizonte, 1987. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.
78. MORAIS, S.A.L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural. Belo Horizonte, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.

79. MORA-PALE, M.; MELI, L.; DOHERTY, T.; LINHERDT, R. J.; DORDICK, J. Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, p. 1229-1245, 2011.
80. NAKASHIMA, K.; WATANABE, H.; AZUMA, J. I. Cellulase genes from the Parabasalian symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*. *Cell Mol. Life Sci.*, p. 59:1554–60, 2002.
81. National Aeronautics and Space Administration (NASA). Water vapor confirmed as major player in climate change, 2008. Disponível em: [http://www.nasa.gov/topics/earth/features/vapor\\_warming.html](http://www.nasa.gov/topics/earth/features/vapor_warming.html).
82. National Aeronautics and Space Administration (NASA). Releases detailed global climate change projections, 2015. Disponível em: <https://www.nasa.gov/press-release/nasa-releases-detailed-global-climate-change-projections>.
83. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Direct measurements: 2005-present, 2015. Disponível em: <http://climate.nasa.gov/vital-signs/carbon-dioxide/>.
84. NEUHAUSER, W., D. HALTRICH, K. D. KULBE, B. NIDETZKY. NAD(P)H dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*. Isolation, characterization and biochemical properties of the enzyme. *Biochem. J.* 326:683–692, 1997.
85. NIDETZKY, B.; NEUHAUSER, W.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 52:387–396, 1996.
86. NIDETZKY, B., NEUHAUSER, W.; MAYR, P.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Strategies to an efficient enzymatic production of xylitol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 864:442–445, 1998.
87. OHTA, K., BEALL, D.S., MEJIA, J.P., SHANMUGAN, K.T., INGRAM, L.O. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (4), 893-900, 1991.
88. OLIVEIRA, E.; SALIBA, S.; MÁRIO, N.; SÉRGIO, R.; LEMOS, A. Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química lignins, p. 917–928, 2001.
89. OLIVEIRA, M. Entre açúcares e genes: Aplicação do conhecimento científico da cana deverá servir ao desenvolvimento de novas ferramentas para a produção de etanol. *Tecnologia, Biocombustíveis*, p. 86-91, 2012.

90. OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, p. 34–50, 2000.
91. PAUL, L. The crisis of the energetic sector. 16th International Economic Conference - IECS 2009. Industrial revolutions, from the globalization and post-globalization perspective, vol I: Industrial revolutions: globalization, post-globalization, p. 166-168, 2009.
92. PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Current Opinion in Plant Biology*, [S. l.], v. 13, p. 305–312, 2010.
93. Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania (PENN-MED). A New Nomenclature for the Aldo-Keto Reductase Superfamily, 2016. Disponível em: <https://www.med.upenn.edu/akr/nomenclature.html>.
94. PHAM; HOA, T.; QUYEN, D. T.; NGHIEM, N. M.; VU, T. D. Cloning, Expression, Purification, and Properties of an Endoglucanase Gene ( Glycosyl Hydrolase Family 12 ) from *Aspergillus niger* VTCC-F021 in *Pichia pastoris*, 21(August), 1012–1020, 2011. <http://doi.org/10.4014/jmb.1104.04030>
95. PLANETA SUSTENTÁVEL. Energia, 2012. Disponível em: <http://planetasustentavel.abril.com.br>.
96. PROTASIO, T.D.; BUFALINO, L.; TONOLI, G.H.D.; GUIMARAES, M.; TRUGILHO, P.F.; MENDES, L.M. Brazilian lignocellulosic wastes for bioenergy production: characterization and comparison with fossil fuels. *Bioresources*, 8, 1166-1185, 2013.
97. ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production, *Biomass and Bioenergy* v. 35, pp. 663-670, 2011.
98. RODRÍGUEZ-CHONG, A., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: A kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v.61, p.143-152, 2004.
99. RUEDA, S.M. Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Universidade de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química (FEQ), 2010.
100. SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p.315–318, 1988.

101. SANTOS, F. A.; QUEIROZ J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do Pré-tratamento Hidrotérmico da Palha de Cana-de-açúcar Visando à Produção de Etanol Celulósico, *Química Nova* v. 37, pp. 56-62, 2014.
102. SCHNEIDER, SH.; EASTERLING, WE.; MEARMS, LO. Adaptation: Sensitivity to natural variability, agent assumptions, and dynamic climatic changes. *Climatic Change*, p. 45: 203–221, 2000.
103. SCRIVENER, A. M.; WATANABE, H.; NODA, H. Diet and carbohydrate digestion in the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotha hilaris*. *J. Insect Physiol*, p. 43:1039–52, 1997.
104. SEIBOTH, B.; HARTL, L.; PAIL, M.; KUBICEK, C. P. D -Xylose Metabolism in *Hypocrea jecorina* : Loss of the Xylitol Dehydrogenase Step Can Be Partially Compensated for by lad1-Encoded L-Arabinol-4-Dehydrogenase. *Eukaryotic cell*, American Society for Microbiology, DOI: 10.1128/EC.2.5.867–875.2003, Vol. 2, No. 5, p. 867–875, 2003.
105. SENDELIUS, J. "Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production", Master of Science Thesis, Departamento of Chemical Engineering, Lund University, Sweden.Engineering, Lund University, Sweden, 2005.
106. SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Straw for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 7402-7409, 2010.
107. SILVA, A. S.; LEE S. H.; ENDO T.; BON, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]), *Bioresource Technology* v.102, pp. 10505-10509, 2011.
108. SPRINGER, E.L. Hydrolysis of aspenwood xylan with aqueous solutions of hydrochloric acid.*TAPPI*,v.49, p.102-106, 1966.
109. SUGA, M.; HATAKEYAMA, T. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe* pretreated with thiol compounds by electroporation. *Yeast* 18:1015-1021, 2001.
110. SUGIMURA, M.; WATANABE, H.; LO, N.; SAITO, H. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris*. *Eur. J. Biochem.* 270:3455–60, 2003.
111. TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5, 1305-1308, 1987.

112. União de Indústrias de Cana de Açúcar (UNICA). Notícias: Etanol. Consumo de etanol hidratado cresceu mais de 37% em 2015, 2016. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/14883647920325965467/consumo-de-etanol-hidratado-cresceu-mais-de-37-por-cento-em-2015/>.
113. WEI, Y.D.; LEE, S.J.; LEE, K.S.; GUI, Z.Z.; YOON, H.J. N-glycosylation is necessary for enzymatic activity of a beetle (*Apriona germari*) cellulase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:331–36, 2005.
114. WEI, Y. D.; LEE, K. S.; GUI, Z. Z.; YOON, H. J.; KIM, I.; ZHANG, G. Z.; JIN, B. R. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 145(2), 220–9, 2006.
115. WEI, Y. D.; LEE, K. S.; GUI, Z. Z.; YOON, H. J.; KIM, I.; JE, Y. H.; JIN, B. R. N-linked glycosylation of a beetle (*Apriona germari*) cellulase Ag-EGase II is necessary for enzymatic activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(6), 435–441, 2006.
116. WILLIS, J. D.; OPPERT, C.; JURAT-FUENTES, J. L. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Science*, 17(3), 184–198. doi:10.1111/j.1744-7917.2010.01322.x, 2010.
117. WILLIS, J. D.; OPPERT, B.; OPPERT, C.; KLINGEMAN, W. E.; JURAT-FUENTES, J. L. Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insect Physiology*, 57(2), 300–6. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.11.019, 2011.
118. WOOD, B.E.; INGRAM, L.O. Ethanol production from cellubiose , amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.58, p.2103-2110, 1992.
119. WOODYER, R.; SIMURDIK, M.; VAN DER DONK, W. A.; ZHAO, H. Heterologous expression, purification, and characterization of a highly active xylose reductase from *Neurospora crassa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1642–7, 2005. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1642-1647.2005>

120. WU, S.; LETCHWORTH, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36(1), 152–154, 2004. <http://doi.org/10.2144/3601A0152>
121. JIN, Y.; PENNING, T.M.; ANNU. *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 263–292, 2007.
122. YOON, L. W.; ANG T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes, *Biomass and Bioenergy* v. 36, pp. 160-169, 2012.
123. ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.
124. ZHAO, X.; PENG, F.; CHENG, K. Enhancement of the Enzymatic Digestibility of Sugarcane Bagasse by Alkaliperacetic Acid Pretreatment. *Enzyme Microbial Technology*, v. 44, pp. 17–23, 2009.
125. ZHOU, S.; INGRAM, L.O. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulose, *Biotechnol.Lett.* v.23, p.1455-1462, 2001.
126. ZHOU, X.; SMITH, J. A.; OI, F. M.; KOHLER, P. G.; BENNETT, G. W.; SCHARF, M. E. Correlation of cellulose genes expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipens*. *Gene* 395:29–39, 2007.